

Chemische Abwehr bei Larven von *Chrysomela tremulae* (Chrysomelidae)

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Hoda Mohagheghi
aus Hannover

1. Referent:

Professor Dr. Dietrich Ober

2. Referent:

Professor Dr. Ludger Beerhues

eingereicht am:

12.03.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am:

27.04.2007

Druckjahr

2007

Danksagung

An dieser Stelle sei denen gedankt, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas, seinen nicht enden wollenden Optimismus, die vielen Ideen und die intensive Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Manfred Nimtz vom HZI für die MS/MS-Sequenzierung und die zahlreichen konstruktiven Diskussionen sowie sein Interesse an meiner Arbeit. Frau Rita Getzlaff vom HZI für die Durchführung der N-terminalen Sequenzierung.

Frau Anita Backenköhler für ihre stete Unterstützung bei allen Fragen im Labor und auch mehr.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dorothee Langel für die vielen anregenden Diskussionen, die gemeinsam verbrachten Jahre als Büronachbarn und ihre zahlreichen Anregungen.

Meinen Kollegen des Instituts für pharmazeutische Biologie, die zu einem freundschaftlichen und guten Arbeitsklima beigetragen haben.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester, die mir in allen Situationen beiseite standen, und meinem Mann für seine Unterstützung und sein großes Interesse an unseren Pappelblattkäfern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wehrmechanismen der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae)	2
1.1.1	Chemische Abwehr der adulten Käfer	4
1.1.2	Chemische Abwehr der Blattkäferlarven	8
1.1.2.1	<i>De novo</i> -Synthese von iridoiden Monoterpenen (IM)	11
1.1.2.2	Sequestrierung phenolischer Glucoside	12
1.1.2.3	Gemischte Strategie der Biosynthese	13
1.1.2.4	Übersicht der verschiedenen Strategien	14
1.1.3	Chemische Abwehr der Blattkäfereier und -puppen	16
1.2	Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien	20
2.1.1	Spezielle Chemikalien	20
2.1.2	Enzyme	21
2.1.3	Primer	21
2.2	Verwendete Organismen und Kulturführung	22
2.2.1	<i>Chrysomeliden</i> : Käfer und Larven von <i>C. tremulae</i> , <i>C. populi</i> und <i>Ph. cochleariae</i>	22
2.2.2	<i>E. coli</i> -Stämme	23
2.3	Plasmide	24
2.4	Molekularbiologische Methoden	25
2.4.1	Primerdesign	25
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA	27
2.4.2.1	TRIZOL [®] -Methode	27
2.4.2.2	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	28
2.4.3	Isolierung von Gesamt-DNA	28
2.4.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	28
2.4.4.1	NucleoSpin [®] Extract II-Kit	28
2.4.4.2	Reinigung aus einem Agarosegel	29
2.4.5	Isolierung von Plasmid-DNA	29
2.4.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach MINIPREP-Methode	29
2.4.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA nach STET-Methode	30
2.4.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA mit Machery und Nagel-Kit	30

2.4.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA mit PROMEGAKit	31
2.4.5.5	Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi)	31
2.4.6	Quantifizierung von RNA und DNA	31
2.4.7	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	32
2.4.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.4.8.1	Nested PCR	34
2.4.8.2	Adapter Ligation-PCR	34
2.4.8.3	Inverse PCR	36
2.4.8.4	Schnelle Amplifizierung von DNA-Enden (RACE)	37
2.4.8.5	Site-directed-mutagenesis	39
2.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.4.10	Klonierungsreaktionen	40
2.4.10.1	Klonierung von PCR-Produkten	40
2.4.10.2	Klonierung in Expressionsvektoren	41
2.4.11	Transformation von kompetenten Zellen	42
2.4.12	Identifizierung positiver Klone	43
2.4.12.1	Blau-Weiß-Selektion	43
2.4.12.2	PCR-Screening	43
2.4.12.3	Restriktionsanalyse	44
2.4.13	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	44
2.4.14	Sequenzierung	45
2.4.15	Computergesteuerte Sequenzanalyse	45
2.5	Biochemische Methoden	46
2.5.1	Proteinbestimmung	46
2.5.2	Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	46
2.5.3	Proteinfällung mit TCA	47
2.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.5.5	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	48
2.5.6	Blotten von Elektrophoresegelen	49
2.5.7	Proteinfärbung	49
2.5.8	2D-Gelelektrophorese	50
2.5.9	Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose	52
2.5.10	Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der SAO	54
2.5.11	Untersuchung der β -D-Glucosidase-Aktivität	55
2.5.12	Deglykosilierung mit PNGase F	56
2.5.13	N-terminale Sequenzierung	56
2.5.14	MS/MS-Sequenzierung	56
3	Ergebnisse	59
3.1	Sequenzierung von Peptiden	60
3.1.1	2D-Elektrophorese des Wehrsekrets von <i>C. populi</i>	60
3.2	Identifizierung von SAO codierenden cDNAs aus <i>C. tremulae</i>	64
3.2.1	Entwurf degenerierter Primer mit Peptiden aus N-terminaler Sequenzierung aus dem Wehrsekret von <i>C. tremulae</i>	64

3.2.2	Probleme bei der RNA-Isolierung und RT-PCR	65
3.2.3	Von der cDNA zur Gesamt-Sequenz	66
3.2.4	Vergleich mit Datenbanken	68
3.2.5	Charakterisierung der cDNA-Sequenz der SAO aus <i>C. tremulae</i> . .	69
3.2.5.1	Site-directed-mutagenesis	70
3.2.5.2	Proteinexpression und Reinigung	71
3.2.5.3	Enzymassay	73
3.2.5.4	Identifizierung der SAO aus <i>C. populi</i>	75
3.2.5.5	Identifizierung einer weiteren SAO aus <i>C. tremulae</i> . . .	76
3.3	Identifizierung einer weiteren GMC-homologen cDNA aus <i>C. tremulae</i> . .	77
3.3.1	Von der RNA zur ganzen Sequenz	78
3.4	Mutmaßliche Katalase aus <i>C. tremulae</i>	80
3.4.1	Bau degenerierter Primer mit Peptiden aus der MS/MS-Sequenzierung aus dem Wehrsekret von <i>C. tremulae</i>	80
3.4.2	Von der RNA zur ganzen Sequenz	81
3.4.3	Vergleich mit Datenbanken	82
3.5	Mutmaßliche β -Glucosidase aus <i>C. tremulae</i>	83
3.5.1	Nachweis einer β -Glucosidase-Aktivität aus dem Wehrsekret	83
3.5.2	Identifizierung einer β -Glucosidase aus dem Wehrsekret von <i>C. tre-</i> <i>mulae</i> mit Hilfe einer nativen PAGE	84
3.5.3	Identifizierung einer cDNA mit Homologie zu β -Glucosidase-co- dierenden cDNAs	85
3.5.4	Vergleich mit Datenbanken	89
3.6	Sequenzierung von Peptiden aus dem Wehrsekret von <i>Ph. cochleariae</i> . . .	89
3.6.1	Probleme bei der RNA-Isolierung und RT-PCR	91
4	Diskussion	93
4.1	Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreductasen	93
4.2	GMC-homologe Sequenzen aus <i>C. tremulae</i> und <i>C. populi</i>	95
4.3	Nuklein- und Aminosäuresequenz der Katalase und einer β -Glucosidase aus <i>C. tremulae</i>	98
4.4	Ausblick	101
A	Abkürzungen	103
B	Primer	106
	Literaturverzeichnis	108

Kapitel 1

Einleitung

Insekten (Insecta), auch Kerbtiere genannt, sind die artenreichste Klasse der Gliederfüßer (Arthropoda) und übertreffen an Artenvielfalt alle übrigen vielzelligen Lebensformen zusammen. Annähernd 80% aller auf der Erde lebenden Tiere sind Insekten (Berenbaum, 2004). Etwa 860.000 Insektenarten sind der Wissenschaft bekannt und sie sind in beinahe jedem Lebensraum anzutreffen. Man schätzt die Gesamtzahl der Insekten auf zehn Trillionen Individuen (Berenbaum, 2004).

Die ältesten fossilen Insekten sind auf 400 Millionen Jahre zur Zeit des Devons datiert. Im Karbon und Perm kam es zu einer Formenexplosion aufgrund der Evolution der Flugfähigkeit, die einen Vorteil gegenüber anderen Organismen, vor allem den Feinden, bedeutete (Campbell und Reece, 2003). Fossilienfunde von Mundwerkzeugen aus verschiedenen Entwicklungsstufen der Insekten in der Zeit des Karbons haben gezeigt, dass eine Spezialisierung in der Ernährung ebenfalls zu einer Radiation der Insekten beitrug. Weit verbreitet ist die These, dass die größte Diversifizierung der Insekten parallel zur Radiation der Blütenpflanzen während der Kreidezeit vor ca. 65 Millionen Jahren verlief (Campbell und Reece, 2003). Ob erst eine Diversifizierung der Blütenpflanzen stattfand, die zu einer Formenexplosion der Insekten führte, oder ob sich erst Herbivoren zu Blütenbestäubern entwickelten, die ihrerseits zu einer Entwicklungsexplosion der Blütenpflanzen führte, ist bis heute unter Forschern umstritten (Campbell und Reece, 2003). Sicher ist aber eine Koevolution von Pflanze und Insekt. Dabei müssen sich sowohl Pflanze als auch Insekt ständig den neuen Gegebenheiten anpassen. Stirbt zum Beispiel eine Pflanze aufgrund von Klimaveränderungen aus, muss sich das darauf lebende Insekt eine neue Wirtspflanze suchen. Die neue Wirtspflanze wiederum, die nun einen neuen Herbivor beherbergt, muss sich gegen diesen zur Wehr setzen und entwickelt Abwehrstrategien, um die eigene Art zu erhalten. Das Insekt muss sich an den Sekundärmetabolismus der Pflanze anpassen und sich zusätzlich gegen andere Herbivoren behaupten. Die Abwehrmechanismen der Insekten sind vielfältig. Einige synthetisieren Substanzen, die sie in bestimmten Sekretbehältern aufbewahren, andere übernehmen (sequestrieren) die zur Abwehr von Herbivoren produzierten Stoffe der Pflanzen für ihre eigene Feindabwehr.

Blattkäfer (Chrysomelidae) bilden mit rund 50.000 beschriebenen, weltweit verbreiteten Arten eine große Familie unter den Käfern (Coleoptera), die mit über 350.000 weltweit verbreit-

teten Arten die größte Ordnung aus der Klasse der Insekten darstellt. Die große Vielfalt der Blattkäfer spiegelt sich in der großen Vielfalt der Abwehrstrategien wider, die im Folgenden beschrieben werden.

1.1 Wehrmechanismen der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae)

Blattkäfer verbringen als phytophage Insekten die meiste Zeit ihres Lebens mit Fressen. Dabei sitzen sie meist auf der Blattoberseite ihrer Wirtspflanze, die sie im Laufe ihres Lebens selten verlassen. Aufgrund ihrer geringen Mobilität und dem ungeschützten Leben auf der Wirtspflanze offerieren sie eine gute Futterquelle für Fraßfeinde wie Vögel oder Ameisen. Daher haben die Blattkäfer verschiedene Strategien der Verteidigung ihrer Art entwickelt, die innerhalb dieser Familie sehr vielfältig sind. Ein Merkmal aller Käfer ist ihr Körperbau: ihre Vorderflügel sind zu harten Flügeldecken (Elytren) umgebildet, die die darunterliegenden Hinterflügel schützen, und sie besitzen ein stark sklerotisiertes Exoskelett. Beides trägt zum Schutz der Tiere bei. Alle Käfer besitzen Flügel, nicht alle können diese aber zum Erreichen genügend großer Distanzen zum Angreifer verwenden.

Einige Abwehrmaßnahmen sind ständig aktiv, wie die kryptische Tracht (griechisch *kryptein*, verbergen) oder Tartracht. Der grüne Schildkäfer (*Cassida viridis*) ist grün gefärbt und hat einen flachen Körperbau, so dass er auf seiner Nahrungspflanze kaum zu erkennen ist. Eine weitere Form der Tarnung ist die Mimese, die Nachahmung von etwas Unbeweglichem und nicht Verzehrbarem. Manche Käfer, wie der Ameisen-Sackkäfer (*Clytra laeviuscula*), tarnen ihre Eier mit Kot. Die Larven leben nach dem Schlüpfen im sogenannten Kotsack weiter und können sich geschützt von Ameiseneiern ernähren ohne selbst gefressen zu werden (Bellmann, 1999).

Die Nachahmung von anderen Organismen wird Mimikry genannt. Insekten ahmen oft Signaleigenschaften eines zweiten Organismus nach, der für einen dritten Organismus zum Beispiel Ungenießbarkeit bedeutet. Dazu können visuelle und chemische Eigenschaften gehören (Dettner und Peters, 1999).

Eine weitere häufig vorkommende Strategie ist der Totstellreflex (Thanatosis). Eine sich nicht bewegende Beute wird von vielen Räubern nicht beachtet und nicht angegriffen. Bei den extrem langsamen Pillenkäfern (*Byrrhidae*) werden die Beine bei Störung angewinkelt und in genau passende Vertiefungen an der Bauchseite gelegt. Somit wird der Käfer für kurze Zeit zu einer kaum angreifbaren Kugel (Dettner und Peters, 1999).

Viele Arten der Chrysomeliden lassen sich bei Gefahr von ihrer Pflanze fallen und ziehen sowohl Beine als auch Fühler eng an ihren Körper. Sie liegen dabei auf dem Rücken und verharren so lange bis die Gefahr vorbei ist. Die akustische Abwehr mittels Stridulation ist bei Insekten weit verbreitet. So vertreiben Grashüpfer ihren Angreifer mit lauten Geräuschen, die sie durch Schieben einer Kammstruktur über eine Kante hervorrufen (Deroe und Pasteels, 1977).

Der Bombadierkäfer (*Brachinus spec.*) hat eine originelle Art der Verteidigung. Bei Gefahr

kann er einen deutlich hörbaren zischenden Knall erzeugen, indem er selbst produzierte Substanzen in einen Hohlraum seines Körpers zusammenbringt, die dort aufgrund vorhandener Enzyme reagieren und zum Knall führen und gleichzeitig das stark reizende Produkt, Benzochinon, in Richtung des Angreifers spritzen (Eisner, 2004).

Festkleben oder Haften auf glatten Oberflächen kann bei Käfern eine besondere Art der Abwehrstrategie sein. *Hemisphaerota cyanea* besitzt verbreiterte Tarsenunterseiten mit Saughaaren auf den Tarsen der sechs Extremitäten. Mittels kohlenwasserstoffhaltiger Flüssigkeitstropfen kann sich der Käfer durch Adhäsion auf der Oberfläche festsaugen, ohne dass ein Angreifer in der Lage wäre, ihn von der Blattoberfläche abzulösen. Folgende Tabelle zeigt die wichtigsten Abwehrmechanismen von Insekten (Dettner und Peters, 1999).

Art der Abwehr	Prozentualer Anteil der wichtigsten Abwehrmechanismen
Chemische Abwehr	46%
Aktive Abwehr (Kampf)	11%
Kryptische Färbung	9%
Flucht	8%
Mimikry	5%
Aposematismus	5%
Optische Abwehr	4%
Abwehr in Gruppen	3%
Mechanische Abwehr (z.B. Festkleben, Haften)	3%
Akustische Abwehr	2%
Thanatose	1%
andere	3%

Die Abwehrmechanismen lassen sich in die aktive und passive Verteidigungsstrategie einteilen. Die aktive Abwehr beinhaltet z. B. Kämpfen, Verstecken und Thanatose während die passive Strategie z. B. aus chemischer Abwehr, kryptischer Färbung oder Mimikry besteht.

Die chemische Abwehr zählt zu den häufigsten Abwehrmechanismen bei Insekten. Chrysomeliden schaffen es, durch diese Substanzen ungenießbar zu sein. Den schlechten Eigengeschmack erreichen sie durch die Freisetzung chemischer Substanzen bei Gefahr, die entweder selbst synthetisiert oder aus der Futterpflanze angereichert werden. Fast ausnahmslos geht der schlechte Geschmack mit einer aposematischen Färbung einher (Pasteels et al., 1982; Pasteels et al., 1988). Aposematismus ist das auffällige Erscheinungsbild eines Organismus, der wehrhaft oder giftig ist oder unangenehm schmeckt.

Mit Hilfe dieser vielfältigen Abwehrmechanismen ist es dem Blattkäfer in allen seinen Lebensphasen über Ei, Larve und Puppe bis hin zum Käfer möglich, sich vor Fraßfeinden zu schützen und das Überleben der Art zu sichern (Termonia und Pasteels, 1999).

1.1.1 Chemische Abwehr der adulten Käfer

Der Name Chrysomelidae stammt von den griechischen Wörtern *chrysos* (gold) und *melanthion* (Käfer) ab und bezieht sich auf die leuchtende metallische Färbung vieler Vertreter dieser Familie (Pasteels et al., 1989). Zusätzlich zur aposematischen Färbung der Käfer sind diese mit Drüsen ausgestattet, die sich im Bereich des Pronotum (Halsschild) und der Elytra (obere harte Flügeldecke) befinden. Diese kommen in den vier Unterfamilien *Criocerinae*, *Chrysomelinae*, *Alticinae* und *Galerucinae* vor (Deroe und Pasteels, 1982). Die Verteilung der Drüsen ist in den einzelnen Unterfamilien unterschiedlich. Im Allgemeinen ist aber eine Verteilung im lateralen Bereich des Pronotum und der Elytra zu beobachten (Deroe und Pasteels, 1982):

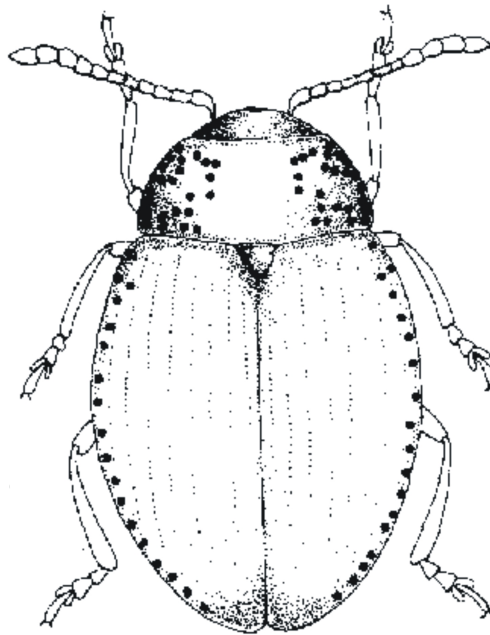


Abbildung 1.1: Verteilung der Drüsen bei *Phaedon cochlearia* (Deroe und Pasteels, 1982)

Werden die Käfer von einem Fraßfeind gestört, setzen sie ein Sekret aus den Drüsen frei, deren Öffnungen sich auf der Oberfläche des Integumentes befinden (in Abbildung 1.1 durch schwarze Punkte markiert).

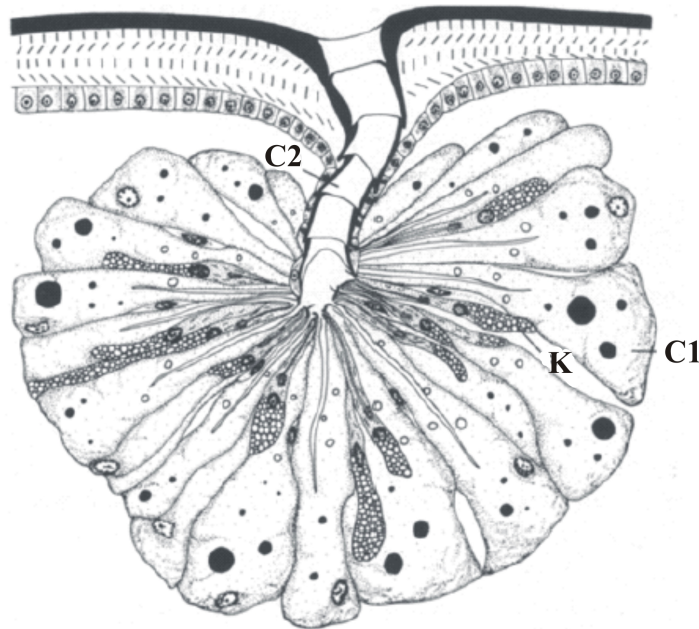


Abbildung 1.2: Wehrdrüse von *Leptinotarsa decemlineata*. C1 und K: Drüsenzellen. C2: Hauptkanal (Pasteels et al., 1989).

Innerhalb der Chrysomeliden variiert die Zusammensetzung des Wehrsekrets stark, eine Übersicht verschiedener Wehrsekrete gibt folgende Tabelle (Pasteels et al., 1988; Pasteels et al., 1994):

Unterfamilie: Chrysomelinae

Unterunterfamilie: Chrysomelina

<i>Chrysomela tremulae</i>	Isoxazolinon-Derivate
<i>Chrysomela populi</i>	Isoxazolinon-Derivate
<i>Chrysomela vigintipunctata</i>	Isoxazolinon-Derivate

Unterunterfamilie: Chrysomelinina

<i>Chrysolina fuliginosa</i>	Cardenolide, Ethanolamin
<i>Chrysolina brunsvicensis</i>	Polyoxygenierte Steroidgluc., Ethanolamin
<i>Chrysolina aurichalcea</i>	Aminosäure-Derivate, Ethanolamin
<i>Oreina gloriosa</i>	Cardenolide, Ethanolamin, Tyrosinbetain
<i>Oreina cacaliae</i>	Pyrrolizidin-Alkaloide, Ethanolamin

Unterunterfamilie: Phyllodectina

<i>Phratora vitellinae</i>	Isoxazolinon-Derivate
<i>Phratora laticollis</i>	Isoxazolinon-Derivate

Unterfamilie: Galerucinae

Diabrotica balteata

Cucurbitacine

Unterfamilie: Alticinae

Diabolia borealis

Iridoide Glucoside

Unterfamilie: Criocerinae

Lilioceris lili

Aminosäure-Derivate

Isoxazolinon-Derivate (Pasteels et al., 1982; Randoux et al., 1991), Cardenolide (Daloze und Pasteels, 1979; Hilker et al., 1992; Van Oycke et al., 1988), polyoxygenierte Steroidglucoside (Daloze et al., 1991; Daloze et al., 1985; Randoux et al., 1990) und Aminosäure-Derivate (Daloze et al., 1991; Pasteels et al., 1989; Timmermans et al., 1992) werden autogen hergestellt, während Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) von den Wirtspflanzen sequestriert werden (Hartmann, 1999; Hartmann und Ober, 2000; Hartmann, 2004; Ober und Hartmann, 2000; Pasteels et al., 2003).

Einige Spezies, die zu den *Alticinae* und *Galerucinae* gehören, besitzen keine Drüsen mehr. Dobler *et al.* (Dobler et al., 1998) stellte zwei Thesen für die evolutive Entwicklung der Drüsen der adulten Käfer auf. Entweder sind die Drüsen allen Chrysomeliden gemein und haben sich nur in einigen Fällen zurückgebildet, oder die Drüsen haben sich innerhalb der Chrysomeliden mehrfach unabhängig voneinander entwickelt. Die Spezies, die keine Drüsen mehr besitzen, haben daher alternative Verteidigungsmechanismen entwickelt. Reflexbluten kommt beim Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) vor: bei Gefahr erscheint im Bereich des Kopfes eine Flüssigkeit in Form eines Tropfens. Es handelt sich um Hämolymphe, die wirksam gegen Ameisen ist (Deroe und Pasteels, 1977). Welche Inhaltsstoffe für die Wirksamkeit gegen Ameisen verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt worden (Armer, 2004). Allerdings wurde vermutet, dass ein toxisches Dipeptid, welches im Wehrsekret des Kartoffelkäfers vorkommt, sich auch in der Hämolymphe befindet (Daloze et al., 1986). In einigen Spezies der *Alticinae* und *Chrysomelinae* ist auch ein Bespritzen des Feindes mit Hämolymphe beobachtet worden (Hollande, 1909). Auch hier sind die Inhaltsstoffe der Hämolymphe bisher nicht identifiziert worden.



Abbildung 1.3: Käfer von *C. tremulae*: A: Fliegender Käfer mit oberer und unterer Flügeldecke. B: Korpulierende Käfer. C, E und F: Käfer im fortgeschrittenen Alter haben einen dunkelroten Panzer, junge frisch geschlüpfte Käfer sind beige und färben sich mit der Zeit orange. D: Eigelege

1.1.2 Chemische Abwehr der Blattkäferlarven

Anders als die adulten Käfer sind die Larven nicht durch einen harten Panzer gegen Angreifer geschützt. Sie leben auf der Blattunterseite und bilden dichte Kolonien, so dass sie eine leichte Beute für Fraßfeinde darstellen. Häufig sind sie durch eine kryptische Färbung getarnt, wie die Larve von *Chrysomela tremulae* (Abbildung 1.4). Andere besitzen zusätzlich Haare und Sklerite. Sklerite sind durch eine Membran oder Naht abgegrenzte harte Abschnitte des Außenskeletts der Insekten.



Abbildung 1.4: Larve im dritten Entwicklungsstadium von *Chrysomela tremulae* mit kryptischer Färbung

Viele Blattkäferlarven der Unterfamilie Chrysomelina und Phyllodectina besitzen neun exokrine Drüsenpaare, die sich dorsal im Meso- und Metathorax und in den folgenden sieben abdominalen Segmenten befinden (Garb, 1915; Hollande, 1909). In Paropsina und einigen *Gonioctena* (Goneoctenina) findet sich nur ein Drüsenpaar zwischen dem achten und neunten Abdominalsegmenten, bei Doryphorina und Chrysolinina nur ein kleines Paar an gleicher Stelle (Garb, 1915; Hinton, 1951; Moore, 1967).

Eine Drüse besteht aus einem kutikularen Reservoir, das in die Körperhöhle versenkt ist und dem eine unterschiedliche Anzahl von Drüsenzellen ansitzt (Abbildung 1.5). Die Drüsenzellen sekretieren Enzyme, die ins Reservoir entlassen werden und dort Wehrsekrete bilden. Die Wehrsekrete enthalten oft flüchtige Substanzen zu Wehrzwecken. Bei Störung der Larve wird der Inhalt des Reservoirs durch Muskelkraft nach außen gedrückt, so dass die flüchtigen Inhaltsstoffe des Wehrsekrets freigesetzt werden (Garb, 1915; Hinton, 1951; Renner, 1970).

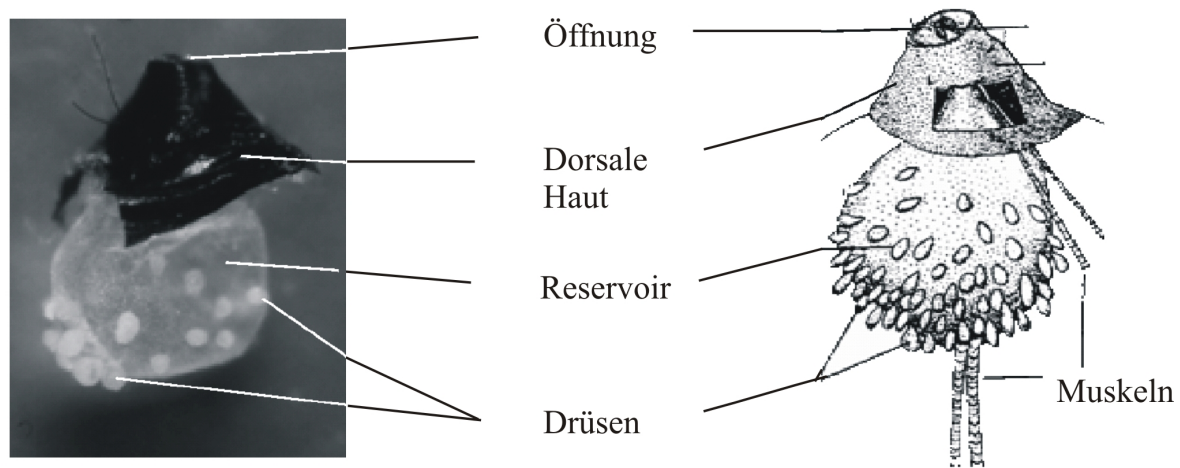


Abbildung 1.5: Exokrine Larvaldrüsen: Foto aus (Kuhn, 2005) und Detailzeichnung von Hinton (Hinton, 1951) (leicht verändert).

Innerhalb der Chrysomelinae gibt es verschiedene Zusammensetzungen der Wehrsekrete. Einige Beispiele für dominierende Inhaltsstoffe sind folgender Tabelle zu entnehmen (Pasteels et al., 1988):

Unterfamilie: Chrysomelinae

Unterunterfamilie: Chrysomelina

<i>Chrysomela tremulae</i>	Salicylaldehyd
<i>Chrysomela populi</i>	Salicylaldehyd
<i>Chrysomela vigintipunctata</i>	Salicylaldehyd, Benzaldehyd
<i>Chrysomela lapponica</i>	Ester der Iso- und 2-Methylbuttersäure
<i>Gastrolina depressa</i>	Juglone
<i>Phaedon cochleariae</i>	Iridoide Monoterpene

Unterunterfamilie: Chrysomelinina

<i>Chrysolina polita</i>	Cardenolide
<i>Oreina tristis</i>	Cardenolide

Unterunterfamilie: Phyllodectina

<i>Phratora vitellinae</i>	Salicylaldehyd
<i>Phratora laticollis</i>	Iridoide Monoterpene
<i>Phratora tibialis</i>	Iridoide Monoterpene
<i>Phratora vulgatissima</i>	Iridoide Monoterpene

Innerhalb der Unterunterfamilie Chrysomelina und Phyllodectina wurden drei verschiedene Wehrsekret-Zusammensetzungen identifiziert. Viele Larven produzieren *de novo* iridoide Monoterpene (Veith et al., 1994). Die meisten *Chrysomela*-Arten und *Phratora vitellinae* se-

questrieren Salicin aus der Wirtspflanze (Weiden und Pappeln) und oxidieren diese zu Salicylaldehyd (Pasteels et al., 1982). Eine weitere Wehrsekret-Zusammensetzung sind Ester der Iso- und 2-Methylbuttersäure (Termonia und Pasteels, 1999; Schulz et al., 1997) (siehe 1.1.2.3).



Abbildung 1.6: *Chrysomela tremulae*-Larven: A, C und D mit dem Salicylaldehyd-haltigen Wehrsekret. B frisch geschlüpfte Larven (rechts) mit Eiern (links) und Größenvergleich mit einem Streichholzkopf.

Termonia et al. (Termonia et al., 2001) hat den Zusammenhang der drei verschiedenen Wehrsekret-Zusammensetzungen phylogenetisch untersucht. Dieser phylogenetische Vergleich auf der Basis mitochondrialer ribosomaler RNA-Sequenzen verschiedener Chrysomelinae-Larven und der qualitative Vergleich der verschiedenen Wehrsekrete (Termonia et al., 2001) lassen vermuten, dass sich drei unterschiedliche Ebenen der Spezialisierung entwickelten: eine autogene, von der Wirtspflanze unabhängige Wehrsekretbildung (iridoide Monoterpen), eine wirtspflanzenabhängige (Salicylaldehyd) und eine Kombination aus autogener und wirtspflanzenabhängiger Synthese (Ester der Iso- und 2-Methylbuttersäure). Dabei wird angenommen, dass die beiden letzten Synthesewege aufgrund von ökologischen Fakto-

ren oder Wirtspflanzenwechsel aus dem ersten, autogenen Weg entstanden sind.

1.1.2.1 *De novo*-Synthese von iridoiden Monoterpenen (IM)

Die meisten Blattkäferlarven der Chrysomelina und Phyllodectina benutzen als Wehrsekret iridoide Monoterpene (IM) wie Plagiodial (*Plagioderia versicolora*) und Chrysomelidial (*Phaedon cochleariae*), die sie *de novo* synthetisieren. Es werden also keine Vorstufen aus der Wirtspflanze genutzt.

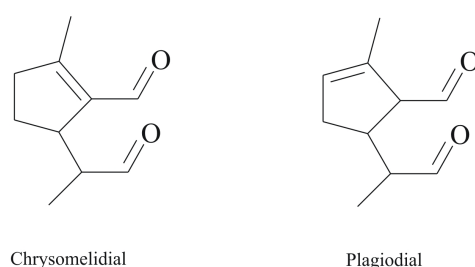


Abbildung 1.7: Wehrsubstanzen in den Wehrsekreten von *Plagioderia versicolora* (rechts) und *Phaedon cochleariae* (links)

Iridoide Monoterpene werden aus Geranioldiphosphat (Geraniol-pp) synthetisiert. Untersuchungen mit Deuterium markiertem Geraniol-pp haben gezeigt, dass die *de novo*-Synthese der iridoiden Monoterpene in Blattkäferlarven der Terpenoid-Biosynthese in Pflanzen entspricht (Lorenz et al., 1993; Veith et al., 1994; Veith et al., 1996).

Geraniol-pp wird hydroxyliert und bildet 8-Hydroxygeraniol, welches anschließend zu 8-Hydroxygeraniol-8-*O*- β -D-Glucosid glykosiliert wird. Bis zu diesem Schritt findet die Synthese in den Drüsenzellen statt. Das Glucosid wird in das Reservoir transportiert und dort von einer β -Glucosidase und einer Oxidase in 8-Oxocitral überführt (Daloze und Pasteels, 1994; Kuhn, 2005). Die Cyclisierung dieses Substrats zur Wehrsubstanz ist in jeder Spezies unterschiedlich und resultiert daher in vielen verschiedenen artspezifischen Zusammensetzungen der Wehrsekrete.

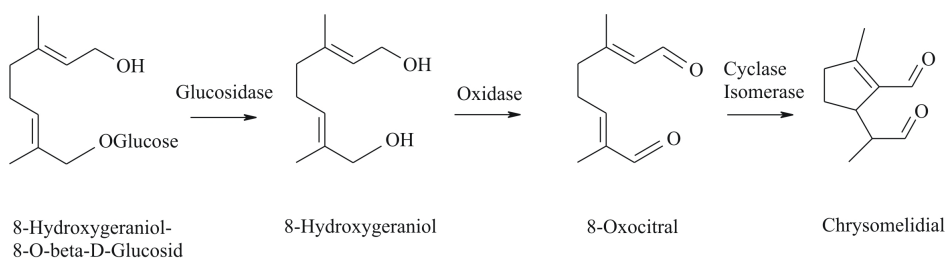


Abbildung 1.8: Iridoide Monoterpene - Syntheseweg

1.1.2.2 Sequestrierung phenolischer Glucoside

Die meisten *Chrysomela* Arten und *Phratora vitellinae* hydrolisieren Salicin, ein Phenolglucosid ihrer Wirtspflanze, und oxidieren das entstehende Aglykon Saligenin zu Salicylaldehyd (Hollande, 1909; Pasteels et al., 1983). Diese Larven fressen ausschließlich auf Pflanzen der Familie Salicaceen (*Salix*, *Populus*).

Drei Enzyme sind an der Bildung des Wehrsekrets beteiligt (Abbildung 1.9):

1. Die Larve nimmt Salicin mit der Nahrung auf und resorbiert dieses aus dem Darm. Das aufgenommene Salicin wird über die Hämolymphe direkt zum Reservoir transportiert. Eine β -Glucosidase, die aus den Drüsenzellen stammt, spaltet im Reservoir die Glucose des Salicins ab und bildet Saligenin. Die Glucose kann von der Larve zur Energiegewinnung resorbiert werden (Rowell-Rahier und Pasteels, 1986). Daher ist diese Art der Wehrsekretbildung gegenüber der *de novo*-Synthese energetisch effektiver. Ein kleiner Teil des Salicins wird bereits im Darm durch β -Glucosidasen hydrolysiert und die Glucose wahrscheinlich ebenfalls resorbiert (Pasteels et al., 1990). Das entstehende Aglykon Salicylalkohol wird vom Darm über die Hämolymphe direkt in das Reservoir aufgenommen.
2. Das Saligenin wird von einer Salicylalkoholoxidase (SAO) oxidiert und bildet die Wehrsubstanz Salicylaldehyd (Brückmann, 2002).
3. Bei der Bildung des Salicylaldehyds entsteht das giftige Wasserstoffperoxid, welches durch eine Katalase entgiftet wird (Brückmann, 2002).

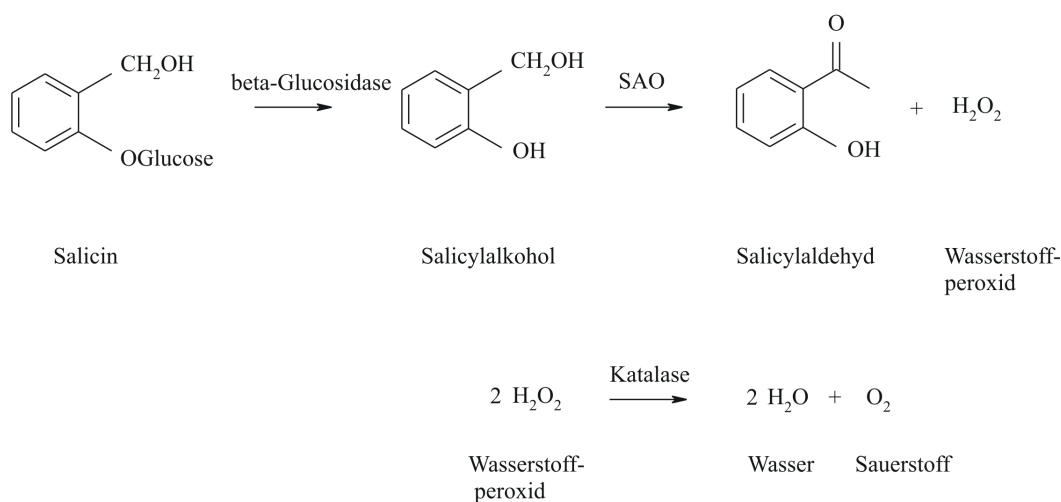


Abbildung 1.9: Salicylaldehyd - Syntheseweg

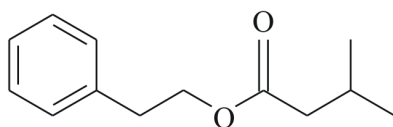
Im frisch gesammelten Wehrsekret konnte gezeigt werden, dass es aus einer organischen und einer wässrigen Phase besteht. Die organische Phase enthält Salicylaldehyd, die wässrige

Phase Salicylalkohol. Untersuchungen zeigten, dass das Verhältnis der organischen Phase zur wässrigen Phase 1:7 beträgt (Brückmann, 2002). Dies bedeutet, dass die Wehrsubstanz nach ihrer Bildung direkt in die organische Phase übergeht und somit der wässrigen Reaktionsphase entzogen wird. Durch diese Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes kann kontinuierlich Salicylaldehyd produziert werden.

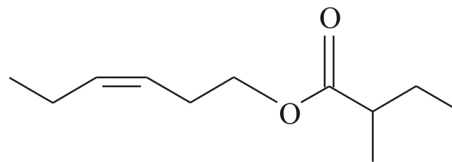
Die größten Feinde der Blattkäferlarven sind Ameisen. Pasteels *et al.* (Pasteels *et al.*, 1986) zeigten, dass Salicylaldehyd als flüchtige Substanz wirksam gegen Ameisen ist. Gross *et al.* (Gross *et al.*, 2002) bewiesen mit ihren Untersuchungen, dass Salicylaldehyd antimikrobiell gegen Pilze wie *Metharizium anisopliae* und Prokaryonten wie *Escherichia coli* auf eine Distanz von bis zu 45 mm wirken kann. Da die Larven nicht nur bei Bedrohung durch Feinde ihr Wehrsekret ausstülpen, sondern auch bei Bewegung eines Blattes oder Störung durch ihre Artgenossen, sind sie permanent von einer Duftwolke umgeben, die sie auch vor Pilz- und Bakterienbefall schützen.

1.1.2.3 Gemischte Strategie der Biosynthese

Eine gemischte Strategie der Biosynthese des Wehrsekrets ist bei Larven der *C. interrupta*-Gruppe zu finden. In ihrem Wehrsekret wurden Ester der Isobutter- und 2-Methylbuttersäure identifiziert (Brown, 1956; Wilcox, 1974; Hilker und Schulz, 1994). Isobutter- und 2-Methylbuttersäure werden von den Larven von *Chrysomela lapponica* und *Chrysomela interrupta* *de novo* aus Aminosäuren synthetisiert und mit verschiedenen Alkoholen, die aus der Pflanze sequestriert werden, verestert (Schulz *et al.*, 1997).



3-Methylbuttersäure-phenethylester



2-Methylbuttersäure-hex-(Z)-3-enylester

Abbildung 1.10: Wehrsekretbestandteile von *Chrysomela lapponica*.

Die Wirtspflanzen dieser Gruppe gehören zu den *Betulaceen* (z. B. Birke) und *Salicaceen* (z. B. Weide). Untersuchungen der Wehrsekrete in Populationen von *Chrysomela lapponica*, die auf verschiedenen Wirtspflanzen leben, ergaben, dass Larven, die auf Weide fressen, zusätzlich zu den Estern auch Salicylaldehyd bilden. Larven, die auf Birken fressen, haben kein Salicylaldehyd in ihrem Wehrsekret (Termonia und Pasteels, 1999). Dieses Ergebnis ist ein eindrucksvolles Beispiel für den Wirtspflanzenwechsel dieser Käferart von *Salicaceen* zu *Betulaceen* mit der damit verbundenen Änderung der Wehrchemie, da in *Betulaceen* keine Vorstufen des Salicylaldehyds vorhanden sind und somit nicht aus der Wirtspflanze sequestriert werden können. Grund für den Wirtspflanzenwechsel von Weide zu Birke könnte eine

Fraßnische sein: Untersuchungen haben gezeigt, dass Parasiten und Fraßfeinde auf Salicaceen anzutreffen sind, nicht aber auf Betulaceen. Betulaceen haben jedoch den Nachteil, dass sie kein Salicin enthalten und die Larven somit ihre chemische Verteidigungsstrategie umstellen mussten (Gross et al., 2004b; Gross et al., 2004a).

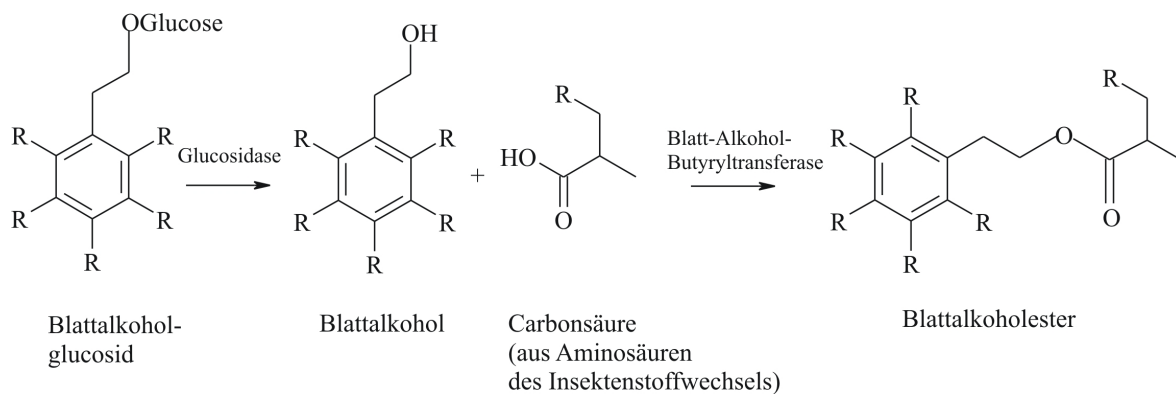


Abbildung 1.11: Blattalkoholester - Syntheseweg.

1.1.2.4 Übersicht der verschiedenen Strategien

Termonia *et al.* (Termonia et al., 2001) haben einen phylogenetischen Stammbaum anhand von 12S und 16S mitochondrialer ribosomaler RNA erstellt (siehe Abbildung 1.12). Aus diesem wird ersichtlich, dass die autogene *de novo*-Synthese iridoider Monoterpene die ursprünglichste Form der Wehrsekretbildung von Chrysomeliden-Larven ist. Der autogene Weg wurde durch die wirtspflanzenabhängige Strategie der Salicylaldehydsynthese ersetzt, nachdem die Tiere vermutlich aus ökologischen Gründen ihre Wirtspflanze gewechselt und sich auf Salicaceen spezialisiert haben. Diese zweite Strategie wiederum entwickelte sich zu einer gemischten Strategie aus autogener und wirtspflanzenabhängiger Synthese.

Der Wechsel von einer autogenen Synthese zu einer wirtspflanzenabhängigen Strategie ist für die Larven energetisch vorteilhaft: die Tiere können nicht nur Vorstufen aus ihrer Wirtspflanze übernehmen, sie resorbieren auch die abgespaltene Glucose aus dem Salicin der Pflanze und verwenden sie in ihrem Stoffwechsel.

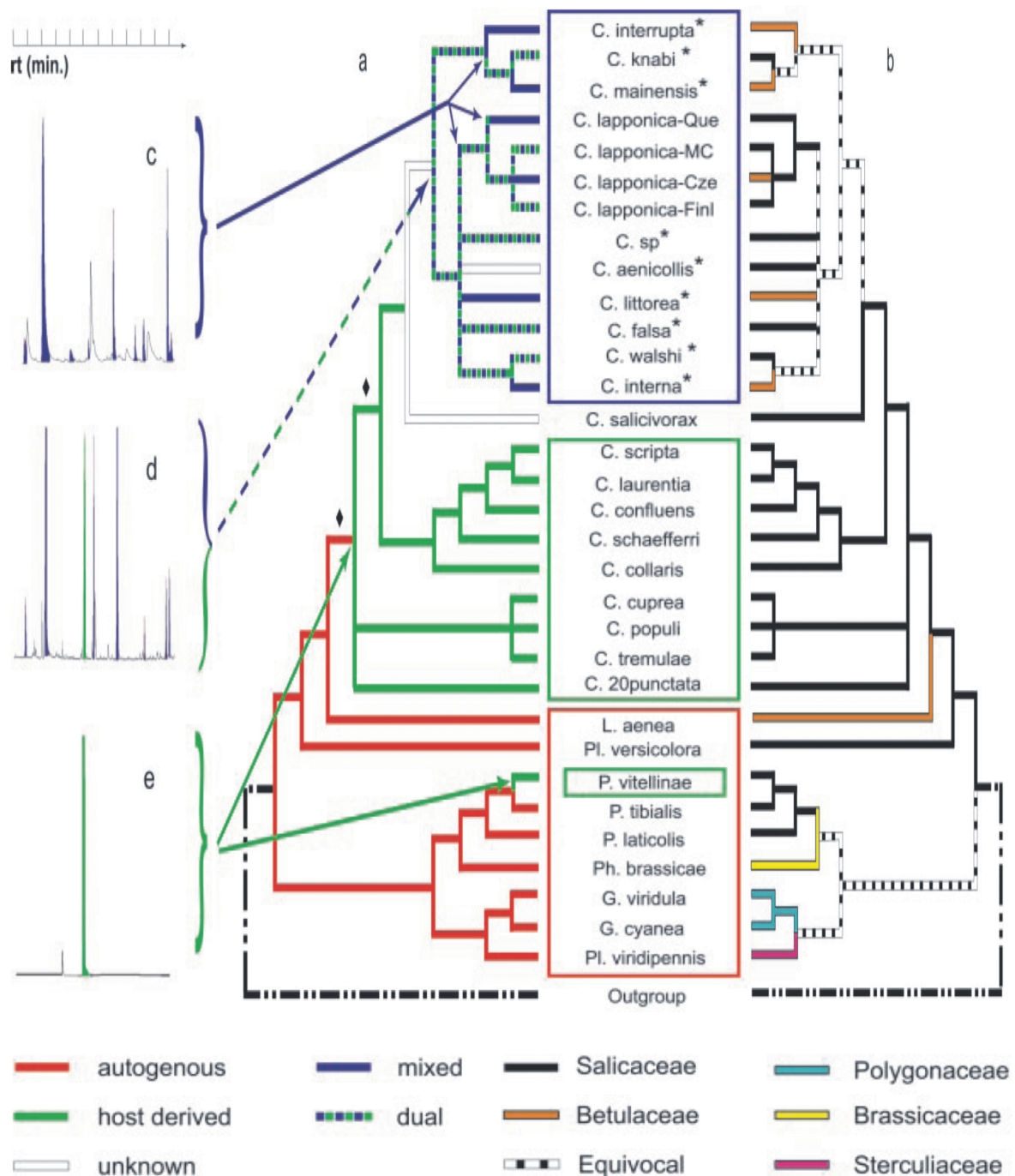


Abbildung 1.12: Evolution von chemischen Verteidigungsstrategien und Wirtspflanzenassoziationen in Chrysomelinae Larven. (a) Entwicklung der Wehrchemie (rot: de novo produzierte IM; grün: Salicylaldehyd aus Salicin (Wirtspflanze Salicaceen); blau: gemischte Synthese). (b) Rekonstruktion der Wirtspflanzenwahl. (c-e) GC-Analysen von Wehrsekreten: gemischte Strategie, gemischte Strategie und Sequestrierung von Pflanzenvorstufen, Sequestrierung von Pflanzenvorstufen: blau = Mischung aus Buttersäuren und Buttersäureestern mit sequestrierten Blattalkoholen; grün: Salicylaldehyd. rt: Retentionszeit (Termonia et al.,

2001).

Die Untersuchungen von Termonia *et al.* (Termonia *et al.*, 2001) haben gezeigt, dass eine Spezialisierung im Fressverhalten und eine wirtspflanzenabhängige Strategie der Wehrchemie nicht zwingend eine Sackgasse der Evolution bedeutet. Die gemischte Strategie (Isobutter- und 2-Methylbuttersäureester), die sich aus der wirtspflanzenabhängigen Strategie entwickelt hat, ist eine Anpassung der Tiere an eine große Bandbreite von Pflanzenarten. Innerhalb der *C. interrupta*-Gruppe sind sowohl Isobutter- und 2-Methylbuttersäureester als auch Salicylaldehyd und ein Gemisch aus beiden in den Wehrsekreten zu finden. Larven, die auf Salicaceen geblieben sind, können Isobutter- und 2-Methylbuttersäureester und Salicylaldehyd synthetisieren (duale Synthese). Larven, die ihre Wirtspflanze gewechselt haben und nun auf Betulaceen fressen, bilden nur Isobutter- und 2-Methylbuttersäureester im Wehrsekret (Abbildung 1.12).

Wie groß die Abhängigkeit der Zusammensetzung des Wehrsekrets von der Wirtspflanze sein kann, haben Untersuchungen von Machkour M'Rabet *et al.* (Machkour M'Rabet und Pasteels, 1999) gezeigt: *Chrysomela lapponica*-Populationen, die auf Phenolglucosid-freien Betulaceen fressen, bilden ausschließlich die Ester der Isobutter- und 2-Methylbuttersäure. Nutzen sie dagegen Phenolglucosid-arme Salicaceen, besteht das Wehrsekret aus einer Mischung der zuvor genannten Ester und Salicylaldehyd. Setzt man diese Population auf Phenolglucosid-reiche Salicaceen, enthält das Wehrsekret nur Salicylaldehyd. Eine hohe Phenolglucosid-Konzentration bewirkt daher eine Verschiebung des Wehrsubstanzspektrums zu Salicylaldehyd, während eine niedrige Phenolglucosid-Konzentration zu einem hohen Anteil an Estern im Wehrsekret führt. Populationen, die ausschließlich auf Betulaceen leben, können nicht mit den Substanzen der Salicaceen umgehen: sie sterben (Hilker, 1993; Gross und Hilker, 1995).

Chrysomela lapponica-Larven besitzen für die Bildung von Estern eine Acyltransferase (Hilker und Schulz, 1994), um die Buttersäure mit dem Alkohol zu verknüpfen. Die Untersuchungen von Machkour M'Rabet *et al.* (Machkour M'Rabet und Pasteels, 1999) haben gezeigt, dass alle *Chrysomela lapponica*-Larven ein solches Enzym besitzen. Die Larven, die jedoch auf Salicaceen fressen, besitzen zusätzlich noch eine Oxidase zur Bildung des Salicylaldehyds. Eine ähnliche Beobachtung wird bei *Chrysomela*- und *Phratora*-Larven gemacht. Beide fressen auf Phenolglucosid-reichen Salicaceen. *Phratora vitellinae* zeigt jedoch zusätzlich zur Oxidase-Aktivität und Bildung von Salicylaldehyd noch eine Oxidase-Aktivität, die zur Bildung von IM-Aldehyden benötigt wird (Veith *et al.*, 1997). Diese Oxidase-Aktivität wird als Überbleibsel der ursprünglichen *de novo*-Synthese der iridoiden Monoterpene interpretiert, die sich im Laufe der Evolution zur Sequestrierung phenolischer Glucoside entwickelte.

1.1.3 Chemische Abwehr der Blattkäfereier und -puppen

Die Eier und Puppen der Blattkäfer weisen einen entscheidenden Nachteil gegenüber Larven und Käfern auf: sie können sich nicht bewegen und sich nicht aktiv gegen einen Angreifer

schützen. Daher sind sie abhängig von ihren 'Vorläufern'. Die Puppen von *Plagiodera versicolora* und *Chrysomela*-Arten hängen an der Unterseite der Blätter ihrer Wirtspflanze. Sie werden von der Exuvie (Körperhülle der Larve) des letzten Larvenstadiums am Blatt verankert. Diese letzte Körperhülle der Larve vor der Verpuppung enthält noch Wehrsekret in den Reservoirs, welches bei Bewegung der Puppe durch Störung freigesetzt wird und somit vor Angreifern schützt (Pasteels et al., 1988). Untersuchungen von Pasteels et al. (Pasteels et al., 1986) haben gezeigt, dass in den Eiern von *Chrysomela* Spezies und in *Phratora vittellinae* hohe Konzentrationen von Salicin (Bitterstoff) enthalten sind. Zusätzlich sind auch Isoxazolinon-Derivate enthalten. Beide Substanzen werden von der Mutter auf die Eier übertragen und können parallel dem Schutz der Eier dienen. Der Vorteil des mütterlichen Salicins liegt darin, dass die frisch geschlüpfte Larve, die noch nicht gefressen hat und somit ungeschützt ist, dieses in Salicylaldehyd umwandeln kann. Dagegen können Larven, die autogen iridoide Monoterpene synthetisieren, in diesem frühen Stadium noch keine Wehrsubstanzen bilden und sind somit ungeschützt (Pasteels et al., 1986).

Weitere Möglichkeiten, um die Eier zu schützen, sind von mechanischer Natur (Hilker, 1994). Einige Chrysomeliden schützen ihre Eier, indem sie sie mit Exkrementen bedecken (*Clytra* Arten). *Phaedon cochleariae* beißt kleine Vertiefungen in das Blatt und legt darin jeweils ein Ei ab. *Zeugophora subspinosa* legt seine Eier in das Parenchym der Blattoberfläche von *Populus*, *Salix* und *Corylus* Arten. Einige *Phratora* Arten bedecken ihre Eier mit einem transparenten Sekret. Unter den Cassidineen ist es weit verbreitet, dass die Mutter auf die Eier und die Larven aufpaßt und diese mit ihrem Körper schützt.

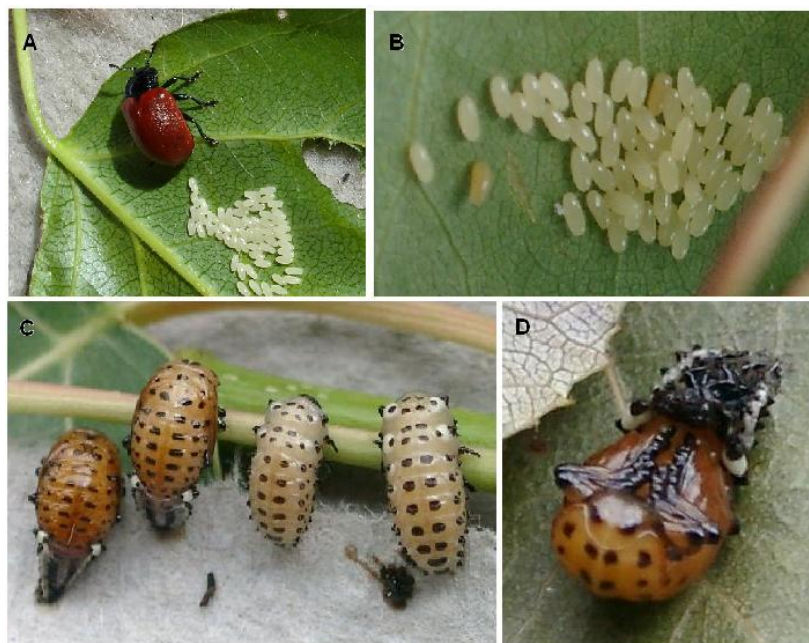


Abbildung 1.13: Puppen und Eier von *C. tremulae*: A Käfer bei Eiablage. B Eier. C Verschiedene Stadien der Puppen. D Puppe, die mit Exuvie am Blatt befestigt ist.

1.2 Ziel der Arbeit

Vergleicht man die ersten zwei Schritte der *de novo*-Synthese der iridoiden Monoterpene und die Bildung von Salicylaldehyd (Abbildung 1.14), wird deutlich, dass in beiden Biosynthesewegen die Substrateigenschaften ähnlich sind und eine Glucosidase und eine Oxidase beteiligt sind. Diese Ähnlichkeit unterstützt die These, dass die zweite Strategie nur durch Veränderungen in zwei bereits existierenden Mechanismen aus der ersten Strategie entstanden ist (Laurent et al., 2003):

1. Änderung der Selektivität des Transportes von Pflanzenglucosiden in die Drüsen (Kuhn et al., 2004).
2. Änderung der Substratspezifität der β -Glucosidase und der Alkoholoxidase, die in das Reservoir sekretiert werden (Pasteels et al., 1983).

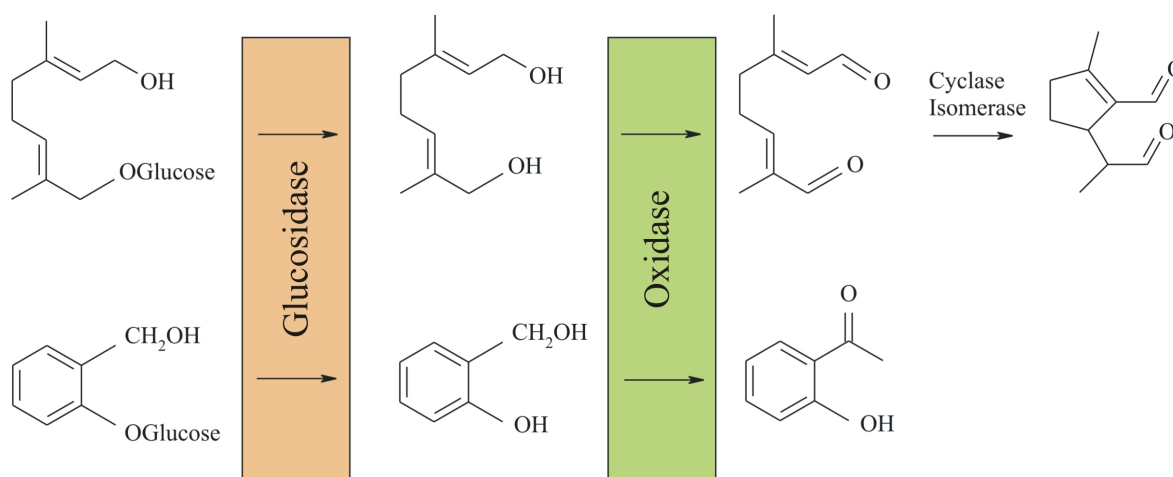


Abbildung 1.14: Vergleich der *de novo*-Synthese der iridoiden Monoterpene (oben) mit der Bildung von Salicylaldehyd (unten).

Ziel der Arbeit ist es, die an der Salicylaldehyd-Synthese beteiligten extrazellulären Enzyme (β -Glucosidase, SAO und Katalase) codierenden cDNA-Sequenzen auf molekularbiologischer Ebene zu identifizieren, um so einen Vergleich dieser Sequenzen mit denen aus Tieren der *de novo*-Synthese der iridoiden Monoterpene zu ermöglichen. Der Vergleich der SAO auf molekularbiologischer Ebene soll die vermutete evolutive Verwandtschaft mit den Oxidasen der autogenen *de novo*-Synthese belegen.

Im Hauptteil der Arbeit wird die SAO mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend heterolog exprimiert. Brückmann *et al.* (Brückmann et al., 2002) hat die extrazelluläre SAO aus *Chrysomela populi* und *Phratora vitellinae* bereits über elektrophoretische Methoden gereinigt und biochemisch charakterisiert. Aus *Chrysomela populi* konnten bereits Peptide ansequenziert werden. Die Ergebnisse von Brückmann (Brückmann, 2002) zeigten, dass es

sich bei der SAO um eine Alkoholoxidoreductase handelt.

Desweiteren werden Untersuchungen zur Identifizierung der extrazellulären Katalase und β -Glucosidase durchgeführt. Die molekulare Charakterisierung und Substratspezifität der β -Glucosidase ist deshalb interessant, da sich die Oxidase im Zuge der Umstellung der Verteidigungsstrategie von autogen zu Salicylaldehyd erst dann ändern musste, nachdem die Glucosidase fähig war, das neue Substrat Salicin zu erkennen und umzusetzen. Die Katalase codierende cDNA wird identifiziert, jedoch hinsichtlich ihrer Substratspezifität nicht weiter untersucht, da sie sich nicht neuen Aufgaben anpassen musste.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die handelsüblichen Chemikalien und Gase der erforderlichen Reinheit wurden, sofern nicht einzeln aufgeführt, von den folgenden Firmen bezogen:

Aldrich	Fluka	Roth
Biomol	Gerbu	Serva
Bio-Rad	Merck	Westfalen

Alle wässrigen Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit Milli Q-Wasser (Fa. Millipore) angesetzt.

2.1.1 Spezielle Chemikalien

Gelelektrophorese

Acrylamid/bis-acrylamid, Rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose, NEEQ Ultra Qualität	Roth
Ammoniumpersulfat	Serva
Bromphenolblau	Merck
Commassie Brilliant Blue R-250	Serva
Ethidiumbromid	Roth
DNA Molecular Weight Marker, 1kb und 100 bp	Invitrogen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol
Protein Molecular Weight Ladder, 10 kDa	Fermentas
TEMED (N,N,N',N',-tetramethylethyldiamin)	Biomol
Xylen cyanol FF	Sigma

Medien zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Agar-Agar	Bernd Euler
Trypton	Roth
Hefextrakt	Roth
Ampicillin, Na-Salz	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid)	Roth
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase)	Roth

2.1.2 Enzyme

Reverse Transkription

SuperScript TM II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen
SuperScript TM III RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Taq-DNA Polymerase (rekombinant)	Invitrogen
Pfx-DNA Polymerase	Invitrogen
AccuTaq LA DNA Polymerase	Sigma
Pfu-DNA Polymerase	Promega

Endonucleasen

Restriktionsenzyme	Invitrogen New England Biolabs (NEB) Fermentas
--------------------	--

Klonierungsreaktionen

T4-DNA Ligase (2 U/ μ l)	Invitrogen
T4-DNA Ligase (5 U/ μ l)	Fermentas

Plasmid-Isolierung

RNase (DNase-frei)	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase H	Invitrogen

2.1.3 Primer

Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) in HPSF Qualität synthetisiert. Die Primer wurden in Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) gelöst, so dass die Stammlösung einer Konzentration von 100 pmol/ μ l entsprach. Die Stammlösung wurde für PCR-Reaktionen mit Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) auf 1 pmol/ μ l oder 10 pmol/ μ l verdünnt und jeweils bei -20° aufbewahrt.

2.2 Verwendete Organismen und Kulturführung

2.2.1 Chrysomeliden: Käfer und Larven von *C. tremulae*, *C. populi* und *Ph. cochleariae*

Die Wirtspflanzen von *C. tremulae* und *C. populi* sind die Schwarzpappel (*Populus nigra*) und die Balsampappel (*Populus balsamifera*). Die Larven fressen vorzugsweise junge Blätter, die an frischen Trieben zu finden sind.

Käfer und Larven von *C. tremulae* und *C. populi* wurden in mit Tüchern ausgelegten Kunststoffbehältern gehalten. Die Deckel enthielten eine mit Fliegengitter bespannte Öffnung zur Luftzufuhr. Käfer, Larven und Eier wurden in getrennten Behältern gehalten. Zur Fütterung wurden frische Zweige von der Wirtspflanze gesammelt und in kleine Eppendorf-Behälter gesteckt, die mit Wasser gefüllt wurden. Die Eier werden von den Käfern auf die Blätter abgelegt. Diese Blätter wurden regelmäßig auf frische Blätter gelegt, so dass die frisch geschlüpften Larven sofort Futter fanden.

Da im Winter keine Pappelblätter vorhanden sind, verbrachten die Käfer wie in der Natur diese Zeit im Winterschlaf. Dazu wurden die Behälter mit Tüchern und alten Blättern ausgelegt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Alle vier Wochen wurden die Tücher leicht befeuchtet.

Käfer und Larven von *Ph. cochleariae* wurden ähnlich wie *C. tremulae* in Plastikbehältern gehalten. Als Futter diente Chinakohl (*Brassica pekinensis*), der das ganze Jahr über erhältlich ist. Die Tiere konnten daher das ganze Jahr kultiviert werden. Die Eier wurden in die Spalten der Kohlblätter gelegt. Sowohl die Eier als auch die frisch geschlüpften Larven sind kaum erkennbar, so dass die Blätter solange aufbewahrt wurden bis die Larven groß genug waren, um sie auf frischen Chinakohl umsetzen zu können.

Zur Gewinnung von Wehrsekret aus den Drüsen der Larven wurden die Tiere mit einer Glaskapillare gereizt und das Wehrsekret mit dieser Glaskapillare (0,5 µl, Roth) direkt aufgesaugt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Wehrsekret konnte im Rohzustand bei 4°C, oder in einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung ausgefällt bei –80°C aufbewahrt werden. Wurde das Wehrsekret in Ammoniumsulfatlösung ausgefällt, wurden jeweils etwa 50 µl Wehrsekret zur Fällung eingesetzt, um genügend Protein für weitere Versuche, wie SDS-Gele zu erhalten.

Die Larven von *C. tremulae* und *C. populi* schlüpften etwa zehn Tage nach Eiablage. Die Larven verpuppten sich nach etwa zwei bis drei Wochen und schlüpften nach ca. sieben Tagen als Käfer. Die Larven von *Ph. cochleariae* brauchten etwas länger, um aus ihren Eiern zu kommen. Die Käfer krochen bereits nach fünf Tagen aus ihrer Puppe.

2.2.2 *E. coli*-Stämme

TOP10 (Fa. Invitrogen)

Dieser Stamm wurde für das TOPO TA Cloning®, TOPO®-XL-Cloning sowie zur Transformation mit pET-Vektoren eingesetzt.

DH5 α TM (Fa. Invitrogen) und XL1-Blue (Fa. Stratagene)

Diese Stämme wurden zur Subklonierung und Vektorvermehrung verwendet. Die mangelnde Fähigkeit zur homologen Rekombination und eine Mutation in der DNA-spezifischen Endonuclease I dieser Zellen erhöhen sowohl Transformationseffizienz als auch die Ausbeute und Qualität isolierter DNA.

BL21(DE3) (Fa. Novagen)

Dieser Stamm wurde zur Expression rekombinanter Proteine mit dem T7-RNA Polymerase/Promotorsystem verwendet. Der Promotor ist induzierbar durch das Lactose-Strukturanalogon Isopropyl-1-Thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG).

Kulturführung

Die Stämme wurden auf Luria-Bertani (LB)-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C kultiviert. Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotikaauslösung bis zu einer Endkonzentration von 50-100 μ g/ml zugesetzt. Die Stammlösungen wurden wie folgt angesetzt:

Ampicillin	10 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	10 mg/ml in H ₂ O

Für eine Blau-Weiß-Selektion transformierter Zellen wurden 50 μ l einer 40 mg/ml Stammlösung von X-Gal auf eine LB-Agarplatte ausplattiert. X-Gal wurde in Dimethylformamid aufgelöst und anschließend in ein mit Aluminiumfolie eingewickeltes Schraubdeckelgefäß sterilfiltriert. Die Stammlösung wurde bei –20°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Zur Anlage einer Dauerkultur wurden 750 μ l Bakterienkultur mit 250 μ l LB-Medium, das 60% (v/v) Glycerin enthielt, versetzt und bei –80°C gelagert.

Medien für *E. coli*

Soweit nicht anders beschrieben wurde zur Herstellung der Medien Milli Q-Wasser (Fa. Millipore) verwendet.

LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)
pH 7,0 mit NaOH	

Zur Herstellung von Festmedienplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1,2% (w/v) Agar zugesetzt.

Bei Transformationen wurden die transformierten Zellen in SOC-Medium kultiviert, damit sie ihre Antibiotika-Resistenz ausbilden konnten (siehe 2.4.11).

SOC-Medium (Sambrook et al., 1989)

Trypton	2,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM (steril filtriert)
MgSO ₄	10 mM (steril filtriert)
Glucose	20 mM (steril filtriert)
pH 7,0 mit NaOH	

Die sterilfiltrierten Lösungen wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Herstellung von kompetenten Zellen

Zur Aufnahme von DNA müssen Empfängerzellen kompetent, also aufnahmefähig gemacht werden. Nur kompetente Zellen sind in der Lage, DNA an ihrer Oberfläche zu binden und sie durch die Membran passieren zu lassen.

Kompetente Zellen wurden nach einer modifizierten Methode von Cohen *et al.* (Cohen et al., 1972) hergestellt. Die Zellen wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C auf dem Inkubations-schüttler inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,6 bis 1,0 erreichte. Die Kultur wurde anschließend 10 Minuten auf Eis gestellt, 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm (Beckmann GS-6R, Rotor GH 3,8) zentrifugiert und dann das Pellet vorsichtig in 25 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde erneut 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 0,1 M CaCl₂, das 15% Glycerin enthielt, vorsichtig gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 4°C für 19 bis 20 Stunden aufbewahrt, um eine hohe Transformationskompetenz zu erreichen. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei –80°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.3 Plasmide

pCR[®]2.1[®]-Vektor und pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen)

Die Vektoren pCR[®]2.1[®] und pCR[®]2.1-TOPO[®] sind Bestandteil der Original TA Cloning[®] und TOPO TA Cloning[®] Kits. Die 3,9 kb großen linearisierten Vektoren sind für die Subklonierung von durch *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte geeignet. Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt eine Transferase-Aktivität, die an die Enden von PCR-Produkten unspezifische 3'-Desoxyadenosin-Überhänge anknüpft. Das PCR-Produkt kann direkt in den

Vektor, der an beiden Enden 3'-Desoxythymidin-Überhänge verfügt, eingefügt werden. Die Klonierung ist abhängig von einer Topoisomerase I. Dieses Enzym ist kovalent an den 3'-Desoxythymidin-Überhang des Vektors gebunden, der diesen aktiviert und so eine Klonierung ohne Verwendung einer weiteren Ligase ermöglicht. Die multiple Klonierungsstelle ist in das lacZ-Gen zur Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.4.12.1) integriert. Als Selektionsmarker dienen das Ampicillin- beziehungsweise das Kanamycin-Resistenzgen.

pCR®XL-TOPO®-Vektor (Invitrogen)

Das 3,5 kb große Plasmid wird verwendet für die Klonierung langer PCR-Produkte und ist eine Weiterentwicklung des pCR®2.1-TOPO®-Vektors. Wie beim pCR®2.1-TOPO®-Vektor ist die Klonierung abhängig von einer Topoisomerase I.

pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega)

Das pGEM®-T Easy Vector System ist ein geeignetes Kit, um PCR-Amplifikate zu klonieren. Der 3 kb große Vektor ist mit *EcoRV* geschnitten. An den 3'-Enden des geschnittenen Vektors ist ein Desoxythymidin angehängt. Diese Desoxythymidin-Überhänge erhöhen die Effizienz der Ligation des PCR-Produktes in das Plasmid, da eine Rezyklisierung des Vektors verhindert wird und Desoxythymidin ein geeigneter Überhang für die Ligation des PCR-Produktes darstellt. Die multiple Klonierungsstelle ist in das lacZ-Gen zur Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.4.12.1) integriert. Das Ampicillin-Resistenzgen dient als Selektionsmarker.

pET-22b(+) (Fa. Novagen)

Der Vektor pET-22b(+) ist ein modifizierter pET-3a-Vektor (Fa. Novagen). Der pET-3a-Vektor wird speziell zur Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* eingesetzt. Das Zielgen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors, die Expression erfolgt nach Induktion der T7-RNA Polymerase, die durch das Genom der Wirtszelle codiert ist. Zur Expression rekombinanter Proteine ist der Vektor mit einer sehr effizienten bakteriellen Ribosomen-Bindungsstelle ausgestattet. Als Selektionsmarker besitzt der Vektor die β -Lactamase, die Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt.

pET-22b(+) ist 3,6 kb groß und enthält eine N-terminale Signal-Sequenz, mit der exprimierte Proteine in den periplasmatischen Raum der Zelle dirigiert werden können. Zusätzlich enthält er eine C-terminale His-Tag-Sequenz, mit der das exprimierte Protein an einer Metall-Chelat-Matrix (zum Beispiel Ni-NTA-Agarose) aufgereinigt werden kann.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Primerdesign

Primer sind nötig, um mit Hilfe der PCR DNA-Abschnitte zu amplifizieren und zu vervielfältigen. Sie wurden bei der Firma MWG-Biotech AG (Martinsried) synthetisiert.

Entwurf degenerierter Primer

Zur Amplifikation bisher unbekannter cDNA-Abschnitte können degenerierte Primer aus den Sequenzdaten des Proteins oder seiner Peptide hergeleitet werden. Es handelt sich bei degenerierten Primern um Oligonucleotide, die zwischen 20 und 30 Nucleotide enthalten.

Zwei Methoden wurden in dieser Arbeit angewendet, um Primer zu entwerfen. Aus einem SDS-Gel wurde ein Protein isoliert und anschließend eine MS/MS-Sequenzierung (siehe 2.5.14) durchgeführt. Auf Grundlage der erhaltenen Peptidsequenzen wurden degenerierte Primer entworfen. Eine weitere Methode ist der Vergleich verschiedener Aminosäure-Sequenzen aus Genbankdaten z. B. mit Hilfe von Genedoc (siehe 2.4.15). Es werden Bereiche innerhalb der Sequenzen identifiziert, die hoch konserviert sind und somit für Primerpositionen in Frage kommen.

Da die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon codiert werden, können die Triplets an einer Position mehr als eine Base enthalten, so dass ein Gemisch aus verschiedenen Primermolekülen entsteht, die sich in der Sequenz an einigen Stellen unterscheiden.

Das Problem der degenerierten Primer ergibt sich aus ihrem Grad der Degeneriertheit. Je höher die Degeneriertheit eines Primers ist, desto geringer ist die Konzentration des Primers, der auf den gesuchten cDNA-Abschnitt passt. Um die Degeneriertheit so klein wie möglich zu halten, kann man bei der Wahl der Primerposition Aminosäuren wählen, die möglichst wenige Codons haben. Bei degenerierten Primern, die an vielen Positionen drei oder vier verschiedene Basen aufweisen, kann man diese Position auch mit der universellen Base Inosin besetzen und dadurch die Degeneriertheit herabsetzen. Inosin passt zu den drei Nucleotiden A, C und T. Eine weitere Möglichkeit ist die Entwicklung mehrerer Primerpopulationen mit jeweils geringer Degeneriertheit statt eines Primers mit hoher Degeneriertheit.

Entwurf genspezifischer Primer (GSP) für die RACE

Genspezifische Primer (GSP) wurden in dieser Arbeit für die Vervollständigung der erhaltenen cDNA-Abschnitte mit Hilfe der RACE-Technik (siehe 2.4.8.4) entworfen. Optimal ist eine Länge von 18 bis 21 Basen. Die Mindestlänge beträgt 15 Basen. Der Primer sollte zu etwa 50% die Nucleotide G und C enthalten. Die Schmelztemperatur der Primer liegt meist zwischen 50°C und 80°C. Die Primer zur Vervollständigung von 5'-Enden wurden so entworfen, dass sie im Bereich der ersten 400 Basen des bekannten Mittelstücks lagen und nach vorne gerichtet waren. Die Primer zur Vervollständigung von 3'-Enden lagen im Bereich der letzten 200 Basen der bekannten Mittelstücke und waren nach hinten gerichtet.

Entwurf genspezifischer Primer für die Expression

Expressionsprimer oder sogenannte Full-length-Primer wurden entwickelt, um durch PCR die gesamte cDNA zu amplifizieren, die anschließend in einen Expressionsvektor kloniert und in einem geeigneten Wirtstamm exprimiert werden sollte. In der vorliegenden Arbeit wurden die pET-Vektoren zur Expression verwendet. Zu diesem Zweck wurden spezielle Full-length-Primer entworfen, die an beiden Enden der cDNA Restriktionsschnittstellen einfügten. Die so modifizierte cDNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ge-

schnitten, so dass sie in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Vektor ligiert werden konnte. Es war darauf zu achten, dass die ausgesuchten Restriktionsenzyme nicht innerhalb der zu klonierenden cDNA schnitten.

Forward-Primer

Der Forward-Primer enthielt eine geeignete Restriktionsschnittstelle. Anschließend folgte ein Startcodon (ATG), dann die Sequenz vom 5'-Ende der cDNA. Bei Verwendung der NdeI-Restriktionsschnittstelle ist das Startcodon ATG bereits Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym. Die spezifische Sequenz der cDNA sollte etwa 30 Basen lang sein, die spezifische Schmelztemperatur zwischen 70°C und 80°C liegen. Eine grobe Formel zur Errechnung der Schmelztemperatur ist die Wallace-Regel, aus welcher auch erkennbar wird, dass die Schmelztemperatur von Länge und Sequenz des Primers abhängt:

$$\text{Schmelztemperatur} = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C} + \text{G})$$

Reverse-Primer

Der Reverse-Primer enthielt die zweite geeignete Restriktionsschnittstelle, gefolgt von der Sequenz des 3'-Endes der cDNA. Die verwendeten pET-Vektoren enthielten hinter der multiplen Klonierungsstelle sechs Histidin-Reste, die eine Aufreinigung des Proteins mit Ni-NTA-Agarose (siehe 2.5.9) ermöglichten. Es sollte darauf geachtet werden, dass sich die Restriktionsschnittstellen im Leserahmen befinden, so dass die Histidin-Reste exprimiert werden konnten.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der RNA-Isolierung angewendet: die TRIZOL[®]-Methode und die Isolierung mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen. In beiden Fällen wurde Gesamt-RNA aus frischen oder bei –80°C eingefrorenen Larven isoliert. Die Larven wurden vor der Tötung in flüssigem Stickstoff mit einer Glaskapillare so lange gereizt, bis die Drüsen komplett frei von Wehrsekret waren, da sich Salicylaldehyd als störend bei der Isolierung der Gesamt-RNA herausgestellt hat (siehe 3.2.2).

2.4.2.1 TRIZOL[®]-Methode

TRIZOL[®] Reagenz von Invitrogen ist ein ready-to-use Reagenz für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischem, pflanzlichem und bakteriellem Gewebe. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

TRIZOL[®] enthält Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Die Proben werden mit Hilfe von sterilen Mörsern und unter Stickstoff homogenisiert und anschließend mit dem TRIZOL[®]-Reagenz versetzt, welches die RNA vor Degradierung schützt. Die Zugabe von Chloroform und eine anschließende Zentrifugation ergibt eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA befindet sich in der wässrigen oberen Phase, während DNA und Proteine in der organischen Phase zu finden sind. Die wässrige Phase wird abpipetiert und anschließend mit

Isopropanol versetzt, um die Gesamt-RNA zu fällen. Vorteile dieser Methode sind die einfache Handhabung, eine schnelle Durchführung und die Reinheit der isolierten Gesamt-RNA.

2.4.2.2 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Die RNA-Proben in Form der ganzen Tiere wurden mit Hilfe von sterilen Mörsern und in flüssigem Stickstoff homogenisiert und anschließend mit einem Lysispuffer, der Guanidin-Isothiocyanat enthält, lysiert. Guanidin-Isothiocyanat inaktiviert RNasen, die in der Lage sind, RNA zu zerstören. Unter Zugabe von Ethanol wird die RNA spezifisch an eine Silika-Gel-Membran (RNeasy mini column) gebunden. Nach einigen Waschschritten wird die gereinigte RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

2.4.3 Isolierung von Gesamt-DNA

Mit dem DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) ist es möglich, die Gesamt-DNA aus verschiedenen Geweben verschiedener Organismen zu isolieren. DNeasy gereinigte DNA ist frei von Kontaminanten und kann zum Beispiel für PCR und Southern Blots eingesetzt werden.

Dieses Kit basiert auf der Grundlage von Silikagel-Membranen, mit denen die Gesamt-DNA isoliert und gereinigt wird. Die Proben werden mit flüssigem Stickstoff mit Hilfe von Mörser und Pistill zu feinem Pulver gemörsert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 180 μl ATL-Puffer gegeben. Anschließend wird die Probe mit Proteinase K lysiert. Mit verschiedenen Puffern werden die lysierten Proben auf optimale Kondition eingestellt, um an die Silikagel-Membran der DNeasy Mini Spin Säulen binden zu können. Durch Zentrifugation werden Kontaminanten und Enzyminhibitoren wie Proteine und Kationen von der an der Säule gebundenen Gesamt-DNA getrennt. Durch anschließende Waschschrte werden übriggebliebene Kontaminanten abgetrennt, die Gesamt-DNA wird mit Puffer oder Wasser eluiert, und kann sofort für weitere Versuche eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische DNA aus frischen oder bei -80°C eingefrorenen Larven isoliert, die Isolierung erfolgte nach dem entsprechenden Protokoll aus dem Handbuch.

2.4.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden aufgereinigt, um diese von den Bestandteilen des Reaktionsansatzes zu befreien und eine Restriktion oder Klonierung in verschiedene Vektoren zu ermöglichen.

2.4.4.1 NucleoSpin[®] Extract II-Kit

Mit dem NucleoSpin[®] Extract II-Kit von Macherey-Nagel können PCR-Produkte für anschließende Restriktion (siehe [2.4.12.3](#)) oder Ligation (siehe [2.4.10](#)) aufgereinigt werden.

Die DNA bindet in Anwesenheit von chaotropen Salzen an eine Silikamembran. Die DNA-enthaltene Lösung wird direkt auf eine NucleoSpin[®] Extract II-Säule gegeben. Kontaminanten wie Salze werden entfernt, die DNA wird mit Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) von der Säule eluiert.

2.4.4.2 Reinigung aus einem Agarosegel

Die Extraktion und Reinigung von PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QIAEX[®] II Agarose Gel Extraction Kit von Qiagen. QIAEX[®] II-Silika-Partikel können sowohl große als auch kleine DNA-Fragmente aufreinigen. DNA-Moleküle werden von den QIAEX[®] II-Silika-Partikeln in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen absorbiert. Kontaminanten wie Salze, Agarose, Proteine oder Ethidiumbromid werden in Waschschritten entfernt, die aufgereinigte DNA wird mit Wasser oder Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) von der Säule eluiert.

2.4.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA ist mit verschiedenen Methoden, abhängig von der weiteren Verwendung der DNA, möglich.

2.4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach MINIPREP-Methode

Mit dieser Methode wird Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse von Klonen aus Bakterien im Kleinmaßstab isoliert. Diese Methode beruht auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) und Ish-Horowicz und Burke (Ish-Horowicz und Burke, 1981).

Es wurde eine Übernachtskultur mit 7 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt. Zweimal 1,5 ml der Übernachtskultur wurden drei Minuten bei 15.300 rpm zentrifugiert und das LB-Medium vollständig mit der Pipette entfernt.

Die Bakterienzellen (Rückstand) wurden in 200 μ l Lösung I suspendiert. Dazu wurden sie mit der Pipette auf- und abgesaugt und anschließend kurz auf Eis gestellt.

Lösung II wurde frisch zusammen pipettiert, bevor pro Probe 400 μ l Lösung II dazugegeben und vorsichtig durch dreimal über Kopf kippen gemischt wurde. Die Proben wurden genau fünf Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden durch Lösung II lysiert, und somit die Plasmid-DNA und die genomische DNA freigesetzt.

Anschließend wurden 300 μ l 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung dazugegeben, gut gemischt und zehn Minuten auf Eis gestellt, wodurch Proteine und die genomische DNA ausgefällt und durch anschließende Zentrifugation (20 Minuten, 15.300 rpm) von der Plasmid-DNA getrennt wurden.

Der klare Überstand enthielt die isolierte Plasmid-DNA. Diese wurde durch Zugabe von 0,6 bis 1,0 Volumenteile Isopropanol 10 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und anschließend 15 Minuten bei 15.300 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 μ l Ethanol (70%ig) gewaschen und drei

Minuten bei 15.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet getrocknet.

Der getrocknete Rückstand enthielt die isolierte Plasmid-DNA, die in 50 μ l Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) gelöst und mit 0,5 μ l RNase A (10 mg/ml, Tris/HCl) versetzt wurde, um noch vorhandene RNA zu verdauen. Der Verdau erfolgte 30 Minuten bei 37°C. Die Plasmid-DNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt werden.

Mit der isolierten Plasmid-DNA kann zur weiteren Analyse eine Restriktionskontrolle durchgeführt werden (siehe 2.4.12.3).

Lösung I		Lösung II	
Glucose	99 mg (50 mM)	H ₂ O, autoklaviert, vorlegen	4000 μ l
Trisaminomethan	30 mg (25 mM)	2 N NaOH	500 μ l
H ₂ O	37 mg (10 mM)	10% SDS	500 μ l

2.4.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA nach STET-Methode

Auch mit dieser Methode wird Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse von Klonen aus Bakterien im Kleinmaßstab isoliert.

Es wurde eine Übernachtskultur in 7 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie angeimpft. Es wurden 1,5 bis 4,5 ml der Übernachtskultur bei 15.300 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Zur Resuspension der Zellen wurden 500 μ l STET dazugegeben und gut geschüttelt. Anschließend wurde frisch zubereitete Lysozymlösung (10 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) zur Lyse der Zellen dazugegeben und zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde bei 95°C für die Dauer von 90 Sekunden erhitzt, anschließend 10 Minuten bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Das Pellet enthielt die gefällten Proteine und die genomische DNA. Diese wurden mit einem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 50 μ l Ammoniumacetat (7,5 M) und 500 μ l Isopropanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet, in 50 μ l Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) gelöst, wie in 2.4.5.1 beschrieben mit RNase A verdaut, um dann eine Restriktionsanalyse durchzuführen.

STET

Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	50 mM
Saccharose	8% (w/v)
Triton X-100	0,5% (v/v)

2.4.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Machery und Nagel-Kit

Die Isolierung reiner Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® System von Machery und Nagel wurde durchgeführt, bevor eine DNA zur Sequenzierung weggeschickt wurde.

Prinzip dieser Methode ist die Bindung der Plasmid-DNA an eine Silika-Membran. Die gebundene DNA wird durch Waschen der Säule mit ethanolhaltigen Puffern von Salzen und zellulären Bestandteilen befreit, anschließend wird die gereinigte Plasmid-DNA mit Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) eluiert. Es werden 2 μ g Plasmid-DNA eingetrocknet und dann sofort zur Sequenzierung eingesetzt. Die genaue Durchführung ist dem Handbuch zu entnehmen.

2.4.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA mit PROMEGAKit

Das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) dient der Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus *E. coli*-Wirtszellen. Die Isolierung wurde ebenfalls durchgeführt, um DNA für eine Sequenzierung aufzureinigen.

Dieses System basiert wie das NucleoSpin® System auf der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silika-Membran. Nach der Lyse der Zellen kann die zu isolierende DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen an die Silika-Membran gebunden werden. Diese Salze können durch Waschpuffer, die Ethanol enthalten, entfernt und die Plasmid-DNA anschließend mit Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) eluiert werden.

Im Kit ist eine sogenannte Alkaline Protease Solution enthalten, die eventuell vorhandene Endonucleasen und andere Proteine aus der Lyse der Bakterienzellen inaktiviert, da diese die Qualität der Plasmid-DNA senken können. Die isolierte Plasmid-DNA kann zur Sequenzierung, aber auch für die PCR verwendet werden. Die genaue Durchführung ist dem Handbuch zu entnehmen.

2.4.5.5 Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi)

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wird durchgeführt, um zum Beispiel Vektor-DNA für die Transformation (siehe 2.4.11) zu vermehren.

Das PureYield™ Plasmid Midiprep System von Promega basiert wie das Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) auf der Bindung der Plasmid-DNA an eine Säule, die anschließend mit Puffern gewaschen wird. Die gereinigte Plasmid-DNA wird dann eluiert.

Mit diesem System ist es möglich 100 bis 200 μ g Plasmid-DNA von high-copy Plasmiden aus einer 50-ml-Übernachtskultur zu erhalten.

Die Durchführung der Isolierung ist dem Handbuch zu entnehmen.

2.4.6 Quantifizierung von RNA und DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte UV-photometrisch bei 260 nm. Bei 280 nm wurde die Proteinverunreinigung gemessen, bei 320 nm die Polysaccharidverunreinigung. Der Quotient aus den Absorptionswerten von 260 nm und 280 nm gibt Aussage über die Reinheit der Probe: liegt der Wert bei 1,8, gilt die Probe als rein. Je mehr Proteine in der Probe enthalten sind, desto niedriger ist der Quotient, da die Proteine bei 280 nm gemessen werden. Ein Absorptionswert von eins bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml und einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml.

Die Proben wurden 1:100 verdünnt und in 10 mm Quarzküvetten im UV-Spectrophotometer (Utraspec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) vermessen.

2.4.7 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die einzelsträngige mRNA in komplementäre cDNA (copy DNA) umschreiben (Lewin, 2002).

Die in der Arbeit verwendete Superscript[®] III (Invitrogen) kann mit Hilfe eines Oligo(dT)-Primers (siehe Anhang B), der an den Poly-A-Schwanz der RNA bindet, komplementäre cDNA synthetisieren. Die cDNA diente als Vorlage für PCR-Reaktionen.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Oligo(dT)-Primer (1 pmol/ μ l)	1 μ l
Gesamt-RNA	bis zu 5 μ g
dNTPs (10 mM)	1 μ l
DMPC-H ₂ O	ad 14 μ l

Der Reaktionsansatz wurde fünf Minuten bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wurde rasch auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Folgende Komponenten wurden hinzugefügt:

5x First Strand Buffer	4 μ l
0,1 M DTT	1 μ l
Superscript III	1 μ l

Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei einer Temperatur zwischen 45°C und 60°C inkubiert. Im Vergleich zu anderen Reversen Transkriptasen ist die Superscript[®] III auch bei hohen Temperaturen (bis 60°C) aktiv und zeigt eine hohe Spezifität. Anschließend wurde die Superscript[®] III bei 70°C inaktiviert. Die cDNA wurde entweder direkt in einer PCR eingesetzt oder bei –20°C gelagert.

2.4.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifizieren kann (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988).

Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt befindet sich zwischen zwei Oligonucleotiden, sogenannten Primern. Diese Primer fungieren als Startermoleküle der Reaktion. Der erste Primer (Forward-Primer) ist komplementär zu einer Sequenz auf dem (+)-Strang der DNA. Der zweite Primer (Reverse-Primer) ist komplementär zu einer Sequenz auf dem (-)-Strang der DNA. Der Abschnitt, den die beiden Primer flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt, so dass das Amplifikat exponentiell vervielfältigt wird.

Jeder Zyklus der PCR durchläuft folgende Schritte:

1. Die doppelsträngige DNA wird bei 94°C für 45 Sekunden denaturiert.
2. Anlagerung (Annealing) der Primer an den komplementären Abschnitt der DNA. Die sogenannte Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Die Dauer der Anlagerung beträgt je nach Template zwischen 60 und 90 Sekunden.
3. Elongation der angelagerten Primer durch die DNA-Polymerase bei 72°C oder 68°C entsprechend der verwendeten DNA-Polymerase. Die Elongationsdauer kann entsprechend der Größe des Templates gewählt werden. Der Richtwert für die Elongationsdauer liegt bei 1000 Basen pro Minute.

In einer Standard-PCR werden die Zyklen 25 bis 30 Mal durchlaufen. Bevor der erste Zyklus anfängt, wird die cDNA mit den Primern für drei bis fünf Minuten auf 94°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu erreichen. Im Anschluss an die Zyklen wird das Gemisch zehn Minuten bei Elongationstemperatur gehalten, damit die DNA-Polymerase die Amplifikate vervollständigen kann. Zum Schluß wird das Gemisch im Thermocycler auf 15°C abgekühlt.

Entsprechend der Templates und der Primer wird zwischen zwei Temperaturprogrammen gewählt. Liegen die Schmelztemperaturen der Primer weit auseinander, wird ein sogenanntes touch down-Programm angewendet. Dabei sinkt die Annealingtemperatur bei jedem Zyklus um 0,5°C. Sind die Schmelztemperaturen der Primer ähnlich, bleibt die Annealingtemperatur konstant. Eine weitere Möglichkeit ist die PCR in einem Gradientencycler. Bei diesem modifizierten Thermocycler können gleichzeitig bis zu zwölf Annealingtemperaturen eingestellt werden. In einer PCR können somit bis zu zwölf Proben bei verschiedenen Annealingtemperaturen amplifiziert werden.

Ein Standard-PCR-Temperaturprogramm sieht wie folgt aus:

touch down		konstant	
94°C	5 min, dann Pause	94°C	5 min, dann Pause
Pause		Pause	
94°C	45 s	94°C	45 s
60°C	1:30 min	60°C	1:30 min
	-0,5°C/ Zyklus		konstant
68°C	5 min	68°C	5 min
Wiederholung	20 x	Wdh.	35 x
94°C	45 sek		
50°C	1:30 min		
68°C	5 min		
Wiederholung	15 x		
68°C	10 min	68°C	10 min
15°C	∞	15°C	∞

Bei Verwendung der *Taq* rekombinant-DNA-Polymerase von Invitrogen oder der AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma wurde ein Mastermix angesetzt, der erst nach dem ersten Denaturierungsschritt bei 94°C zugesetzt wurde. Der Grund ist die Aktivität der Polymerase bereits während der Aufheizphase im Thermocycler. Dadurch kann es zur Verlängerung von nicht spezifisch angelagerten Primern kommen, oder von Primern, die sich aneinander lagern. Durch den sogenannten Hot-Start werden diese unerwünschten Wechselwirkungen reduziert.

Primer Mix	<i>Taq</i> rek.	AccuTaq	<i>Pfu</i>	<i>Pfx</i>
10 μ M Forward Primer	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
10 μ M Reverse Primer	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
cDNA (Template)	1 μ l	1 μ l	2 μ l	2 μ l
H ₂ O	ad 15 μ l	ad 15 μ l	-	-
Mastermix				
10xPCR-Puffer	2,5 μ l	2,5 μ l	5 μ l	5 μ l
50 mM MgCl ₂	0,75 μ l	-	-	- μ l
50 mM MgSO ₄	-	-	-	0,5 μ l
10 mM dNTP Mix	0,5 μ l	1,25 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l
5U/ μ l <i>Taq</i> rek.	0,125 μ l	-	-	-
5U/ μ l AccuTaq	-	0,125 μ l	-	-
3U/ μ l <i>Pfu</i>	-	-	0,5 μ l	-
3U/ μ l <i>Pfx</i>	-	-	-	0,5 μ l
H ₂ O	6,125 μ l	6,125 μ l	37,5 μ l	37,0 μ l
Endvolumen	25 μ l	25 μ l	50 μ l	50 μ l

2.4.8.1 Nested PCR

Die nested PCR dient der Erhöhung der Spezifität der PCR-Reaktion. Die Primer einer nested PCR lagern sich innerhalb des DNA-Abschnitts an, der in einer ersten PCR von dem ersten Primerpaar abgesteckt wurde. Als Template der nested PCR wurde 1 μ l des ersten PCR-Ansatzes verdünnt eingesetzt. Der erste PCR-Ansatz wurde mit Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) 1:1000 verdünnt. Das entstehende PCR-Produkt ist kleiner als das Amplifikat aus der ersten PCR.

2.4.8.2 Adapter Ligation-PCR

Mit Hilfe der Adapter Ligation-PCR kann man unbekannte genomische DNA, die an einen bereits bekannten Teil der Sequenz angrenzt, amplifizieren. Diese PCR-Methode wurde entwickelt, um Introns und Promotorregionen zu identifizieren.

Es wurden GenomWalker Adapter (nach der Methode des Clontech-Kits) benutzt, die an die Schnittstelle der verdauten DNA ligiert wurden. Als Primer einer PCR dienten der Adapter-Forward-Primer, der komplementär zum GenomWalker Adapter ist, und ein genspezifischer

Primer, der im bekannten Teil der Sequenz liegt. Die PCR-Amplifikate konnten kloniert und sequenziert werden.

Die Adapter Ligation-PCR umfasste vier Schritte:

1. Die genomische DNA wurde aus dem tierischen Gewebe mit Hilfe des DNeasy® Tissue Kit (Qiagen) isoliert (siehe 2.4.3).
2. Aliquots der genomischen DNA (1-2 µg) wurden mit jeweils einem Restriktionsenzym geschnitten (siehe 2.4.12.3), die blunt ends erzeugten. Die Restriktionsenzyme sollten die DNA im Bereich des 5'-Endes der bereits bekannten Sequenz schneiden und eine Erkennungssequenz von sechs Basen haben, da diese spezifischer schneiden als Restriktionsenzyme mit weniger Basen in der Erkennungssequenz.
3. Jede geschnittene, blunt end-DNA wurde anschließend aufgereinigt (siehe 2.4.4.1) und mit dem GenomeWalker Adapter ligiert, so dass verschiedene Pools entstanden, die jeweils Adapter-ligierte DNA-Fragmente enthielten:

verdaute und gereinigte genomische DNA	4,95 µl
(1-2 µg genomischen DNA aus Restriktionsansatz, siehe 2.)	
50 µM GenomeWalker Adapter (A +B)	0,95 µl
5x Ligation Puffer	1,6 µl
T4-DNA-Ligase (Invitrogen)	0,5 µl

Der Reaktionsansatz wurde 16 Stunden bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 72°C für die Dauer von 15 Minuten inaktiviert.

Durch die Ligase wurde der GenomeWalker Adapter A an die Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende der verdauten DNA gebunden. Die Amino-Gruppe des GenomeWalker Adapter B blockierte das 3'-Ende der mit dem GenomeWalker Adapter A ligierten DNA, um eine Extension durch die Anlagerung des Primers AP1 zu verhindern. Es konnten nur Amplifikate in Richtung des 5'-Endes der DNA entstehen.

4. Die Adapter-ligierte DNA wurde 1:100 mit Tris/HCl (10mM, pH 8,0) verdünnt und in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt. In der ersten PCR wurde ein Adapter-spezifischer Primer AP1 als Forward-Primer und ein genspezifischer Primer (GSP1) als Reverse-Primer eingesetzt. Der GSP1-Primer lag am 5'-Ende im bekannten Teil der DNA. Die nested PCR wurde mit einem zweiten Adapter-spezifischen Primer AP2 als Forward-Primer und einem zweiten genspezifischen Primer (GSP2) durchgeführt. GSP2 lag vor dem ersten genspezifischen Primer (siehe 2.4.1).

Die PCR wurde mit Hilfe der AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma durchgeführt. Diese Polymerase hat die Eigenschaft, DNA-Fragmente mit einer Länge von bis zu 20

kb amplifizieren zu können. Zusätzlich enthält die Polymerase Proofreading-Aktivität. Das PCR-Temperaturprogramm entsprach dem touch down-Programm (siehe 2.4.8) mit zwei Abweichungen: das Template wurde nur zehn Sekunden bei 94°C denaturiert, da genomische DNA bei längerer Inkubation nicht stabil bleibt. Die Elongationszeit betrug 15 Minuten, um auch die vollständige Amplifikation großer Fragmente zu ermöglichen.

PCR-Ansatz:

Primer Mix für erste PCR

10 μ M GSP1-Primer	0,5 μ l
10 μ M AP1	0,5 μ l
Template: Adapter-ligierte DNA (1:1000)	1.0 μ l
H ₂ O	ad 15 μ l

Primer Mix für nested PCR

10 μ M GSP2-Primer	0,5 μ l
10 μ M AP2	0,5 μ l
Template: 1:100 verdünnter Ansatz aus der ersten PCR	1.0 μ l
H ₂ O	ad 15 μ l

Mastermix

10x PCR-Puffer	2,5 μ l
10 mM dNTP Mix	1,25 μ l
AccuTaq	0,25 μ l
H ₂ O	ad 10 μ l

Die Annealingtemperatur der PCR entsprach den Schmelzpunkten der eingesetzten Primer (siehe 2.4.8).

2.4.8.3 Inverse PCR

Mit Hilfe der Inversen PCR können wie mit der Adapter Ligation-PCR (siehe 2.4.8.2) unbekannte Bereiche der genomischen DNA, die an einen bereits bekannten Teil der Sequenz angrenzen, identifiziert werden.

Die Inverse PCR umfasste vier Schritte:

1. Die genomische DNA wurde aus dem tierischen Gewebe mit Hilfe des DNeasy[®]Tissue Kit (Qiagen) isoliert (siehe 2.4.3).
2. Aliquots der genomischen DNA (1-2 μ g) wurden mit jeweils einem Restriktionsenzym geschnitten (siehe 2.4.12.3), die blunt ends erzeugten. Die Restriktionsenzyme

sollten die DNA im Bereich des 5'-Endes der bereits bekannten Sequenz schneiden und eine Erkennungssequenz von sechs Basen haben, da diese spezifischer schneiden als Restriktionsenzyme mit weniger Basen in der Erkennungssequenz (siehe 2.4.8.2).

3. Jede geschnittene DNA wurde aufgereinigt und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas) mit sich selbst ligiert. Um die Selbstligation zu fördern, wurde der Ligationsansatz stark verdünnt. Es entstanden Ansätze mit jeweils vielen ringförmigen DNA-Molekülen.

verdaute genomische DNA	20 μ l
(1-2 μ g genomischen DNA aus Restriktionsansatz, siehe 2.)	
T4-DNA Ligase (Fermentas)	25 μ l
10x T4 DNA-Ligase-Puffer	25 μ l
PEG 4000	25 μ l
H ₂ O	ad 250 μ l

Die Reaktion wurde 16 Stunden bei 16°C inkubiert.

4. Mit einer Ethanol-fällung wurde die DNA aufkonzentriert und gereinigt. Es wurden 125 μ l 7,5 M NH₄OAc und 750 μ l Ethanol (100%ig) zum Reaktionsansatz dazugegeben und bei -20°C für die Dauer von 20 Minuten gefällt. Anschließend wurde die Probe 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das Pellet mit Ethanol (70%ig) gewaschen, getrocknet und in 25 μ l dest. H₂O aufgenommen.
5. Die PCR wurde mit Hilfe von zwei spezifischen Primern durchgeführt, die im Gegensatz zur Standard-PCR nicht aufeinander zugerichtet sind. Der eine Primer zeigte in den unbekannten Bereich, der andere in Richtung der Restriktionsstelle im bekannten Bereich der Sequenz. Bei einer PCR wurde so ein DNA-Ring amplifiziert. Das PCR-Temperaturprogramm entsprach dem der Adapter Ligation-PCR (siehe 2.4.8.2).

2.4.8.4 Schnelle Amplifizierung von DNA-Enden (RACE)

Die schnelle Amplifizierung von DNA-Enden (RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends) ermöglicht die Vervollständigung der DNA-Fragmente, die mit Hilfe degenerierter Primer erhalten wurden (siehe 2.4.8). Diese Technik beruht auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Dabei wird ein Bereich zwischen dem unbekannten Teil der Sequenz und einem internen Bereich der bekannten Gensequenz (genspezifische Primer, siehe 2.4.1) amplifiziert (Frohmann et al., 1988).

cDNA-Synthese für RACE

Die 3'-RACE-PCR wurde mit einer cDNA-Erststrangsynthese unter Verwendung eines Poly-dT-Primers (Oligo(dT)-Primer, siehe Anhang B) begonnen. Der Oligo(dT)-Primer hybridisiert im Bereich des Poly-A-Schwanzes der mRNA (siehe 2.4.7). Der RNA-Strang aus dem

Hybrid-Doppelstrang wurde unter Zugabe von RNase H abgebaut. Es folgte eine PCR mit dem Oligo(dT)-Primer und einem sequenzspezifischen Primer (GSP). Bei dieser PCR wurde selektiv der DNA-Bereich zwischen dem Poly-A-Schwanz der cDNA und dem spezifischen Primer amplifiziert.

Ähnlich wurde bei der 5'-RACE-PCR vorgegangen. Ein von der bekannten Sequenz abgeleiteter Primer (GSP1) wurde zur cDNA Erststrangsynthese verwendet. Nach Abbau des mRNA-Stranges erfolgte eine Verlängerung des cDNA-Stranges an dessen unbekanntem 5'-Ende um 20-100 Basen. Diese Verlängerung wird Tailing genannt. Die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) katalysierte diese Reaktion, in die einer der vier Desoxynucleotide eingesetzt wurde. Wurde dCTP eingesetzt, so konnte neben dem genspezifischen Primer als zweiter Primer der sogenannte Anker Amplification Primer- oder Abridged Universal Amplification Primer (AAP, AUAP, siehe Anhang **B**) in der PCR eingesetzt werden. AAP bzw. AUAP enthielten einen Poly-G-Bereich, der mit dem Poly-C-Schwanz der getailten cDNA hybridisieren konnte. Wurde die cDNA mit dATP getailt, wurden als Primer der genspezifische Primer und der Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Oligo(dT) hybridisierte mit dem künstlich angefügten Poly-A-Schwanz der getailten cDNA.

Die Durchführung sah wie folgt aus:

1. Reverse Transkription mit genspezifischen Primern und Superscript III:

Gesamt-RNA	bis zu 5,0 µg
GSP1 (1 pmol/µl)	2,0 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl
RNase freies Wasser	ad 15,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

Anschließend wurden auf 50°C vorgewärmter 5x First Strand Buffer (5,0 µl) und DTT (3,0 µl) (Invitrogen) hinzugefügt und zwei Minuten bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 µl Superscript III (Invitrogen) wurde die Reaktionslösung eine Stunde bei 55°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 15 Minuten bei 70°C inaktiviert, bevor 1,0 µl RNase H dazugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Die cDNA konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

2. Aufreinigung der cDNA:

Die cDNA wurde mit Hilfe des Nucleo[®] Spin Extract II von Macherey und Nagel aufgereinigt (siehe 2.4.4.1).

3. TdT-Tailing der cDNA (Invitrogen):

5x Tailing Puffer	5,0 μ l
dCTP bzw. dATP (2 mM)	2,5 μ l
aufgereinigte cDNA	10,0 μ l
RNase freies Wasser	6,5 μ l

Der Reaktionsansatz wurde zwei bis drei Minuten auf 94°C erhitzt, eine Minute auf Eis gestellt und zentrifugiert. Anschließend wurde 1,0 μ l Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT, Invitrogen) dazugegeben, 10 Minuten bei 37°C und danach 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die getailte cDNA konnte bei –20°C aufbewahrt werden.

2.4.8.5 Site-directed-mutagenesis

Die Site-directed-mutagenesis erlaubt die Mutation einer doppelsträngigen DNA an jeder gewünschten Stelle mit Hilfe der PCR. Dabei werden zwei entgegengesetzte Primer, die jeweils die gewünschte Mutation enthalten, eingesetzt. Die Primer lagern sich bei der PCR an die entsprechende Stelle und können das mutierte PCR-Produkt amplifizieren. Mit Hilfe eines *DpnI*-Verdau wird die alte DNA-Vorlage, die methyliert ist, geschnitten. Die alte DNA-Vorlage ist methyliert, da sie aus *E. coli* stammt. Nur die nicht methylierte mutierte DNA, die von *DpnI* nicht geschnitten werden kann, wird in *E. coli* transformiert.

Die genaue Durchführung ist dem Handbuch QuikChange Site-Directet Mutagenesis Kit von Stratagene zu entnehmen.

2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung und Isolierung von Nucleinsäuren. Grundlage dieser Methode ist die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Phosphatgruppen der Nucleinsäuren sind unter elektrophoretischen Bedingungen ionisiert und die Polydesoxynucleotide liegen als Polyanion vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße. Eine Größenanalyse der aufgetrennten DNA-Moleküle erfolgt durch Vergleich mit im Gel aufgetragenen Standard-DNA-Molekülen, sogenannte DNA-Leitern, bekannter Größe. Je nach Größe der aufzutrennenden Nucleinsäuren werden 1%ige, 1,5%ige oder 2%ige Agarosegele verwendet (Sambrook und Russel, 2001).

Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle solange aufgekocht, bis die Lösung klar war. Die Lösung wurde auf etwa 50°C abgekühlt. Anschließend wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 μ l/10 ml Agaroselösung dazugegeben. Da Ethidiumbromid toxisch ist, wurde unter dem Abzug gearbeitet. Ethidiumbromid dient der Detektion der Nucleinsäuren im Agarosegel unter ultraviolettem Licht. Es lagert sich zwischen die Basen der Nucleinsäuren, so dass diese unter UV-Licht als orange leuchtende Bande erscheinen. Die abgekühlte Lösung wurde in einen Gelschlitten mit Gelkamm gegeben und bis zur Erstarrung stehengelassen.

Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V bis die Bromphenolblau-Front etwa 2/3 des Gels durchwandert hatte (vor der DNA laufende Bande). Die Auftrennung der Nucleinsäuren konnte auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 300 nm ausgewertet werden. Als Längenstandard wurde sowohl eine 100bp- als auch eine 1kb-DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen.

10x TBE-Puffer		Ladepuffer	
Tris Base	90 mM	Xylencyanol	0,25% (w/v)
Borsäure	90 mM	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
EDTA	2 mM	Ficoll 400	25% (w/v)
H ₂ O	ad 1 l	EDTA	50 mM

2.4.10 Klonierungsreaktionen

Im folgenden Abschnitt wird die Klonierung von PCR-Produkten mit dem Ziel der Sequenzierung und der Expression in pET-Vektoren beschrieben.

2.4.10.1 Klonierung von PCR-Produkten

Klonierung in TOPO[®]-TA und TOPO[®]-XL (Invitrogen):

PCR-Produkte können nach Aufreinigung aus einem Agarosegel (siehe 2.4.4.2) direkt in die pCR[®]2.1-TOPO- und pCR[®]XL-TOPO-Vektoren kloniert werden. Die *Taq*-DNA-Polymerase hängt im Laufe der PCR aufgrund ihrer matrizenunabhängigen Terminalen-Transferase-Aktivität Desoxyadenosin an das 3'-Ende der PCR-Produkte. So erhaltene PCR-Produkte können direkt in den Vektor ligiert werden, da dieser einen 3'-Desoxythymidin-Überhang enthält.

Alte PCR-Produkte und PCR-Produkte, die mit *Pfx*-DNA Polymerase oder *Pfu*-DNA Polymerase amplifiziert werden, müssen 15 Minuten mit einer *Taq*-DNA-Polymerase bei 72°C inkubiert werden, um einen Desoxyadenosin-Überhang für die Ligation in den Vektor zu erhalten.

TOPO [®] -TA		TOPO [®] -XL	
aufgereinigte DNA	4 µl	aufgereinigte DNA	4 µl
pCR [®] 2.1-TOPO-Vektor	1 µl	pCR [®] XL-TOPO-Vektor	1 µl
Salt Solution	1 µl	6x TOPO Cloning Stop Solution	1 µl

Bei TOPO[®]-TA-Cloning wurden alle Reaktionsbestandteile gut vermischt, anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Transformation in kompetente Zellen (siehe 2.2.2) auf Eis gestellt.

Bei TOPO[®]-XL-Cloning wurden die aufgereinigte DNA und der Vektor gut vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur (ca. 22°C) inkubiert. Anschließend wurde 1 µl TOPO

Cloning Stop Solution (6x) dazugegeben und bei Raumtemperatur gut vermischt. Dieser Reaktionsansatz konnte auf Eis oder bei -20°C bis zur Transformation in kompetente Zellen maximal 24 Stunden (siehe 2.4.11) aufbewahrt werden.

Klonierung in pGEM[®]-T Easy Vector (Promega):

Das pGEM[®]-T Easy Vector System ermöglicht die Klonierung von aufgereinigten PCR-Produkten (siehe 2.4.4.2) in den pGEM[®]-T Easy Vektor. Die Vektoren sind mit *EcoRV* geschnitten und enthalten einen 3'-terminalen Desoxythymidin-Überhang an beiden Enden. Dies ermöglicht eine effiziente Ligation der PCR-Produkte in den Vektor. Wie bei der Klonierung in TOPO[®]-TA und TOPO[®]-XL hängt auch hier die *Taq*-DNA-Polymerase im Laufe der PCR Desoxyadenosin an das 3'-Ende der PCR-Produkte. Die erhaltenen PCR-Produkte können daher direkt in den Vektor ligiert werden.

Es wurde folgender Ansatz zur Ligation des PCR-Produktes mit dem pGEM[®]-T Easy Vektor zusammen pipettiert:

aufgereinigte DNA	1,5 μl
pGEM [®] -T Easy Vektor	0,5 μl
T4-DNA-Ligase	0,5 μl
2x Rapid Ligation Buffer	2,5 μl

Die Lösung wurde gut durchmischt und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur (ca. 22°C) inkubiert. Es folgte die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Zellen (siehe 2.4.11).

2.4.10.2 Klonierung in Expressionsvektoren

Die zu exprimierende cDNA wurde in einen Expressionsvektor kloniert, der anschließend in *E. coli* zur Expression transformiert wurde. Als Expressionsvektoren wurde der pET-Vektor pET-22b(+) verwendet (siehe 2.3).

Der zu exprimierenden cDNA wurden durch PCR mit Expressionsprimern (siehe 2.4.1) zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen angefügt. Der Vektor enthielt die gleichen Restriktionsschnittstellen in seiner multiplen Klonierungsstelle. Der pET-Vektor und das PCR-Amplifikat wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, so dass an der cDNA als auch im Vektor komplementäre Enden, sogenannte sticky ends (klebrige Enden), entstanden. Eine T4-DNA Ligase ligierte diese sticky ends miteinander. Das entstehende Plasmid konnte in *E. coli* transformiert werden.

Die PCR mit Expressionsprimern wurde mit *Pfx*-, *Pfu*- oder AccuTaq LA DNA Polymerase durchgeführt (siehe 2.4.8), da sie eine hohe Lesegenauigkeit (Proofreading-Aktivität) besitzen. Lesefehler sollten für die spätere Expression vermieden werden. Das PCR-Produkt wurde wie unter 2.4.4.2 beschrieben aufgereinigt und anschließend mit den beiden Restriktionsenzymen inkubiert.

Ein Restriktionsansatz sah wie folgt aus:

Verdau der cDNA bzw. Vektors

gereinigte cDNA bzw. Vektor	1,0 μg
10x Restriktionspuffer	1,0 μl
10 u/ μl Restriktionsenzym	1,0 μl
H ₂ O	ad 10 μl

Der Ansatz wurde drei Stunden bei der vom Enzym benötigten Temperatur inkubiert und anschließend nach 2.4.4.2 aufgereinigt. Der zweite Restriktionsverdau wurde wie beschrieben ausgeführt (diesmal in einem 20 μl -Ansatz). In einigen Fällen war ein Doppelverdau möglich, da der gleiche Restriktionspuffer für beide Enzyme geeignet war.

Die aufgereinigten, geschnittenen PCR-Produkte konnten mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase mit dem Vektor ligiert werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert in doppelsträngigen DNA-Molekülen die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden. DNA-Moleküle können daher in linearisierte Vektoren inseriert werden.

Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Vektor (10 fmol)	x μl
Zielgen (30-90 fmol)	y μl
5x Reaktionspuffer	2,0 μl
T4-DNA-Ligase (Invitrogen)	0,5 μl
H ₂ O	ad 10 μl

Die Reaktion wurde 16 Stunden bei 4°C oder 22°C oder eine Stunde bei 25°C inkubiert. Die genaue Durchführung als auch besondere Hinweise sind den Beipackzetteln der Enzyme zu entnehmen.

2.4.11 Transformation von kompetenten Zellen

Transformation ist die Übertragung freier und löslicher DNA in eine Bakterienzelle. Zur Aufnahme von DNA müssen Empfängerzellen kompetent, also aufnahmefähig, gemacht werden. Nur kompetente Zellen sind in der Lage, DNA an ihrer Oberfläche zu binden und sie durch die Membran passieren zu lassen.

Unmittelbar vor der Transformation wurden die bei –80°C in Aliquots gelagerten kompetenten Zellen (siehe 2.2.2) langsam auf Eis aufgetaut.

Allgemein wurde die Transformation in den folgenden vier Schritten durchgeführt:

1. 5 μl Ligationsansatz (siehe 2.4.10) oder 1-2 μl Plasmid (unverdünnt, siehe 2.4.5) wurden mit 100 μl kompetenter Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

2. Die Zellen wurden für 60 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten (Hitzeschock).
3. Die Zellen wuchsen und bildeten die Antibiotikaresistenz in 400 μ l zugegebenem SOC-Medium bei 37°C auf dem Inkubationsschüttler für 60 Minuten aus.
4. 100 bis 200 μ l des Ansatzes wurden auf LB-Platten ausplattiert, welche das dazugehörige Antibiotikum enthielten. Die ausplattierten Kulturen wurden etwa 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.4.12 Identifizierung positiver Klone

Die Identifizierung positiver Klone, das heißt Plasmide, die die klonierte DNA enthielten, erfolgte mit Hilfe der unten aufgeführten Methoden. Die Blau-Weiß-Selektion erlaubte eine Identifizierung der positiven Klone noch vor der Plasmid-Isolierung, das PCR-Screening und die Restriktionsanalyse wurden nach der Plasmid-Isolierung durchgeführt und ermöglichten eine weitere Untersuchung der Klone.

2.4.12.1 Blau-Weiß-Selektion

Klonierungen, bei denen DNA-Fragmente in die Vektoren pCR[®]2.1[®], pCR[®]2.1-TOPO[®] und pGEM[®]-T Easy kloniert werden, können mittels Blau-Weiß-Selektion überprüft werden. Diese Methode basiert auf der Grundlage, dass β -Galactosidase das künstliche Substrat X-Gal in ein blaues Produkt umwandelt. Der Vektor enthält den N-terminalen Teil des β -Galactosidase-Gens, in dem sich die multiple Klonierungsstelle befindet. Die Wirtszellen, in die die Vektoren transformiert werden, enthalten im Genom den C-terminalen Teil des β -Galactosidase-Gens. Nach der Transformation eines leeren Vektors in die Wirtszellen wird das Gen der β -Galactosidase vervollständigt. Das β -Galactosidase-Gen wird exprimiert und kann das in der LB-Platte enthaltene X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen. Die entstehende Kolonie ist tiefblau. Enthält der Vektor die klonierte DNA in der multiplen Klonierungsstelle, wird die N-terminale Sequenz der β -Galactosidase unterbrochen. Das β -Galactosidase-Gen kann nicht mehr funktionell exprimiert und X-Gal nicht mehr gespalten werden. Die Wirtszellen, die den Vektor mit der klonierten DNA enthalten, bilden somit weiß gefärbte Kolonien und können für weitere Analysen verwendet werden.

2.4.12.2 PCR-Screening

Gewachsene Kolonien können mit Hilfe eines PCR-Screenings nach der Plasmid-Isolierung auf positive Klone untersucht werden. Positive Klone sind *E. coli*-Kolonien, die erfolgreich mit Fremd-DNA enthaltenen Plasmiden transformiert wurden. Dazu wurde die Plasmid-DNA verdünnt als Template in einer PCR eingesetzt. Als Primer dienten diejenigen, mit der die zu klonierende cDNA bereits amplifiziert wurde. Die PCR wurde wie in 2.4.8 beschrieben durchgeführt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.9) kontrolliert.

2.4.12.3 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonucleasen der Klasse II erkennen in doppelsträngiger DNA palindromartige Sequenzen und hydrolisieren die beiden DNA-Stränge jeweils spezifisch zwischen zwei Basen. Dadurch entstehen Enden mit definierten Basenabfolgen. Je nach Enzym können sogenannte sticky ends oder blunt ends erzeugt werden.

Ist die Sequenz der zu untersuchenden DNA oder des Vektors bekannt, können mit Hilfe der Restriktionsanalyse gleiche Klone bzw. unterschiedliche Klone aufgrund des Bandenmusters identifiziert werden. Die Restriktionsanalyse wurde mit der Plasmid-DNA aus 2.4.5.1 oder 2.4.5.2 durchgeführt. Restriktionsenzyme wurden außerdem in der vorliegenden Arbeit bei Klonierungsreaktionen in Expressionsvektoren (siehe 2.4.10.2) und zum Nachweis von erfolgreicher Klonierung der Fremd-DNA in den Vektor angewendet.

Ein Standard-Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

	Restriktionskontrolle	Expressionsansatz mit Doppelverdau
DNA	3,0 μ l	20 μ l
10x Restriktionspuffer	0,4 μ l	3 μ l
Restriktionsenzym	x μ l (1 unit)	je 10 units pro 10 μ l Ansatz
H ₂ O	ad 4,0 μ l	ad 40 μ l

Die optimale Temperatur für eine Restriktionsanalyse ist dem Beipackzettel des Herstellers des Enzyms zu entnehmen.

Waren zur Untersuchung der Plasmid-DNA zwei Restriktionsenzyme nötig, so konnte ein Doppelverdau dann durchgeführt werden, wenn beide Enzyme im gleichen Restriktionspuffer und bei der gleichen Temperatur Aktivität besitzen. War ein simultaner Verdau nicht möglich, wurde erst das Restriktionsenzym verwendet, dessen Restriktionspuffer die niedrigere Salzkonzentration enthielt.

2.4.13 Proteinexpression in *E. coli*

Wie in 2.4.10.2 beschrieben wurde das Zielgen zur Expression in *E. coli* in pET-Vektoren ligiert. Das Konstrukt wurde in DH5 α transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm hat eine hohe Transformationsrate und wird daher zur Vermehrung der Plasmid-DNA eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit waren TOP10-Zellen. War die Transformation gelungen, wurde die isolierte Plasmid-DNA in BL21 (DE3) transformiert, um das Zielgen zu exprimieren. Die pET-Vektoren enthalten das T7-RNA Polymerase/ Promotorsystem (Studier et al., 1990). Durch die hohe Selektivität und Aktivität der T7-RNA Polymerase kann der Anteil des gewünschten Proteins bereits wenige Stunden nach der Induktion mehr als 50% des Gesamtproteins ausmachen.

Zur Expressionskontrolle wurde eine Übernachtskultur mit 7 ml LB und 35 μ l Antibiotikum (Endkonzentration im Medium: 50-100 μ g/ml) angeimpft. Am nächsten Tag wurden 1,0 ml der Übernachtskultur entnommen, mit LB gewaschen und in 50 ml LB-Medium mit 100 μ l Antibiotikum (Endkonzentration im Medium: 50-100 μ g/ml) überführt und bis zu

einer OD_{600nm} von 0,6 bis 1,0 bei 37°C inkubiert. Danach wurden zur Induktion 100 μ l IPTG (Endkonzentration: 0,1 M) dazugegeben und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Vor und nach der Induktion wurden 1 ml-Proben gezogen, welche jeweils anschließend auf einem SDS-Gel zur Expressionskontrolle aufgetragen wurden (siehe 2.5.4).

2.4.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde bei MWG durchgeführt. Dazu wurde Plasmid isoliert (2.4.5). Es wurden 2 μ g Plasmid bei Raumtemperatur eingetrocknet und zu MWG geschickt.

2.4.15 Computergesteuerte Sequenzanalyse

Die Untersuchung von Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe von Computerprogrammen, die zum GCG Wisconsin Software Package gehören, das auf einem Server der Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung in Göttingen (GWDG) zur Verfügung stand. Alternativ wurde auch freie Software aus dem Internet genutzt.

GCG	Softwarepaket zur Analyse und Bearbeitung von Sequenzen und Vergleich in verschiedenen Datenbanken. Ist verfügbar auf dem Server: http://gcg.gwdg.de
Genedoc	http://www.psc.edu/biomed/genedoc/ Editor für die Erstellung und Bearbeitung von Alignments.
Chromas	Software zum Öffnen und Bearbeiten von Chromatogramm-Daten von DNA-Sequenzierungen.
TreeView	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html Anzeigen und Bearbeitung der graphischen Darstellung von Phylogenien.
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST Erlaubt den Vergleich von Sequenzen mit verschiedenen Datenbanken auf Protein- oder DNA-Ebene.
Tribolium	http://tribolium.uni-koeln.de/blast/blast.html Erlaubt den Vergleich von Sequenzen mit dem Tribolium-Genom auf Protein- oder DNA-Ebene.
Fasta	http://www.ebi.ac.uk/fasta33/ Erlaubt den Vergleich von Sequenzen mit verschiedenen Datenbanken auf Protein- oder DNA-Ebene; ist sehr spezifisch in der Suche nach Homologien langer Sequenzen; Vergleich der Sequenzen gegen ganze Genom- und Proteomprojekte ist möglich.
Restriction	http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl

Mapper	Vorhersage von Restriktionsstellen einer eingegebenen Nucleotid-Sequenz.
ExPASy	http://www.expasy.org/ Vorhersage verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einer bestimmten Sequenz bzw. des codierten Proteins.
SignalP 3.0 PSORT	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ http://psort.nibb.ac.jp/form2.html Vorhersage eines Signalpeptids in einer Proteinsequenz von Pro- und Eukaryonten sowie die intrazelluläre Lokalisation des Proteins.
Brenda	http://www.brenda.uni-koeln.de Informationsdatenbank für Enzyme.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) photometrisch bestimmt. Die Methode beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Es kommt zu einer Farbänderung des Farbstoffmoleküls von rot nach blau. Die resultierende Absorptionsänderung von 495 nm nach 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration. Zur Bestimmung wurden 20 μ l Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption in Halbmikroküvetten der Schichtdicke 1 cm bei 595 nm am UV/VIS-Spektrometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia) vermessen. Vor jeder Bestimmung wurde eine Kalibriergerade von 0,1 bis 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein erstellt.

Bradford-Reagenz:

In 50 ml Ethanol (abs.) wurden 100 mg Serva Blau G gelöst, anschließend 100 ml 85%ige Phosphorsäure (v/v) dazugegeben, mit Wasser auf 1 l ergänzt und filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.5.2 Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteine aus Wehrsekreten waren in einigen Fällen in Ammoniumsulfat gefällt (Brückmann, 2002) (siehe 2.2.1). Für weitere Versuche mussten die Proben gelöst und von Ammoniumsulfat befreit werden. Dies geschah durch PD10-Säulen, über die die Proben entsalzt wurden. Gleichzeitig konnte die Proteinlösung über die PD10-Säulen auf einen Standardpuffer umpuffert werden, um zum Beispiel Versuche wie eine SDS-PAGE (siehe 2.5.4)

oder ein Enzymassay (siehe 2.5.10) durchführen zu können.

Das in Ammoniumsulfat gefällte Wehrsekret wurde für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die gefällten Proteine zu konzentrieren. Der Niederschlag wurde in 2,5 ml Standardpuffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 6,0) gelöst und anschließend entsalzt. Dazu wurden PD10-Fertigsäulen (GE Healthcare) eingesetzt, die vor Gebrauch mit 25 ml Standardpuffer äquilibriert wurden. Nach Auftragen von 2,5 ml Probe wurde mit 3,5 ml Standardpuffer eluiert. Bei kleineren Probenvolumina (0,5 oder 1,0 ml) wurde nach Einziehen der Probe mit Standardpuffer auf 2,5 ml ergänzt und mit entsprechend kleinen Volumina Standardpuffer (1,1 bzw. 2,0 ml) eluiert. Die Eluate enthielten quantitativ die Proteine.

Zur Regeneration wurde das Säulenmaterial mit einem Säulenvolumen 0,2 M NaOH und vier bis fünf Säulenvolumen 0,5 M NaCl-Lösung gespült. Danach konnten die Säulen bei 4°C mit 0,05% NaN₃ gelagert und wiederverwendet werden.

Zur Aufkonzentration der entsalzten Proben diente das Verfahren der Ultrafiltration. Es standen Vivaspin 6-Konzentratoren der Firma Vivascience zur Verfügung. Sie haben eine Ausschlussgrenze der Membran von 30 kDa und eignen sich für Proben bis zu einem Volumen von 6,0 ml. Bei maximal 8000 x g (DuPont Sorvall RC-5B, SS-34 Rotor oder Sigma 3K1 mit Ausschwingrotor) wurde 30 Minuten zentrifugiert und die Proben bis auf ein Volumen von etwa 30 - 50 µl eingengt.

2.5.3 Proteinfällung mit TCA

Proteine können aus wässriger Lösung mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) und Desoxycholat (DOC) ausgefällt werden. Die Proteine werden zunächst in DOC solubilisiert und dann mit TCA ausgefällt. Zur Probe wurden 1/10 Volumenteile TCA (55% TCA in H₂O) und 1/10 Volumenteile 0,1% Desoxycholat in 0,02% Natriumazid gegeben. Dieser Ansatz wurde gut vermischt und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Probe zentrifugiert, das Pellet enthielt das gefällte Protein.

2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist die zentrale Methode zur Kontrolle der Proteinexpression, zur Überprüfung der Effektivität von Proteinreinigungen sowie zur Molekulargewichtsbestimmung und Proteinauftrennung eines Proteingemisches (Sambrook et al., 1989). Grundlage der Trennung von Proteinen in einem SDS-Gel ist ihre Wanderung in einem elektrischen Feld. Acrylamid bildet nach dem Auspolymerisieren Poren, in denen größere Moleküle stärker retardiert werden als kleine. Durch Zusatz des negativ geladenen Detergenzes SDS werden die Proteine negativ geladen, so dass das Verhältnis von Masse zu Ladung in einem Protein keinen Einfluss auf seine Wanderungsgeschwindigkeit hat und die Proteine daher nur aufgrund ihrer Größe getrennt werden.

Die Trennung erfolgte im Mini-Protean III Electrophoresis System der Firma Bio-Rad mit dem Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsgeber.

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

2x Probenpuffer		10x SDS-Elektrodenpuffer	
H ₂ O	2,70 ml	Tris-Base	30 g
Tris/HCl 0,5 M pH 6,8	1,00 ml	Glycin	144 g
Glycerin	2,00 ml	SDS	10 g
10% (w/v) SDS-Lösung	3,30 ml	H ₂ O	ad 1000 ml
2- β -Mercaptoethanol	0,50 ml	Keinen pH einstellen!	
0,5% (w/v) Bromphenolblau	0,50 ml		

	Sammelgel	Trenngel	Trenngel
	4%	10%	12%
H ₂ O	3,00 ml	4,00 ml	3,30 ml
30% Acrylamidlösung	0,65 ml	3,30 ml	4,00 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,30 ml	-	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	2,50 ml	2,50 ml
10% (w/v) SDS-Lösung	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml

Nach dem Gießen und Auspolymerisieren von Trenn- und Sammelgel wurden die aufzutragenden Proteinlösungen im Verhältnis 1:2 mit 2x Probenpuffer versetzt und fünf Minuten zur Denaturierung bei 95°C inkubiert. Abhängig von der Größe der verwendeten Gelkämme wurden maximal 15 bzw. 20 μ l Probe aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden die Markerproteine von Fermentas verwendet. Die Elektrophorese in 1:10 verdünntem 10x SDS-Elektrodenpuffer erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V bei abnehmender Stromstärke (Startwert 75 mA) in etwa 45 Minuten.

Die Anfärbung der Proteinbanden direkt in den Gelen erfolgte durch Coomassie-Blau-Färbung (siehe 2.5.7). Zum Nachweis sehr geringer Proteinmengen sowie zum Blotten von Elektrophoresegelen (siehe 2.5.6) wurden die Proteine aus dem ungefärbten SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.5.6).

2.5.5 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native PAGE wurde entsprechend der Bedingungen für die SDS-PAGE durchgeführt, allerdings waren alle Puffer und Lösungen frei von 2- β -Mercaptoethanol und SDS und damit nicht reduzierend und nicht denaturierend. Im Probenpuffer, im 10x Elektrodenpuffer sowie in den Gelen wurden diese Komponenten durch entsprechende Mengen H₂O ersetzt. Die im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzten Proben wurden ohne Inkubation bei 95°C direkt in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung bei

100 V durchgeführt. Je nach weiterer Verwendung wurde das Gel angefärbt (siehe 2.5.7) oder geblottet (siehe 2.5.6).

2.5.6 Blotten von Elektrophoresegelen

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) wird Blotten genannt. Das Blotten erfolgt mit der Multiphor II Nova Blot electrophoretic transfer unit (Pharmacia) und dem Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsgeber.

Der Proteintransfer aus SDS- oder nativen Gelen auf die Membran wurde im semi-dry-Verfahren durchgeführt. Die Blotmembran wurde kurz vor dem Transfer mit Methanol benetzt und anschließend zusammen mit vier Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier (3MM, Schleicher & Schuell) kurz in Blotpuffer äquilibriert. Die Graphitplatten der Blotkammer wurden ebenfalls mit Blotpuffer befeuchtet und anschließend die einzelnen Lagen luftblasenfrei wie folgt geschichtet:

Anode (obere Graphitplatte)

2 Lagen Whatman

PVDF-Membran

Gel

2 Lagen Whatman

Kathode (untere Graphitplatte)

Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 120 mA bei einem Gel, bei 160 mA bei zwei Gelen bzw. bei 240 mA bei vier Gelen.

Die Anfärbung der Proteinbanden auf der Membran erfolgte durch Coomassie-Blau-Färbung. Nach dem Blotten wurde die Membran mit H₂O gespült und 3-4 min mit Coomassie (siehe 2.5.7) angefärbt. Anschließend wurde mit Blotentfärber 5-10 min entfärbt, mit H₂O gespült und an der Luft getrocknet.

10x Blotpuffer		1x Blotpuffer	
Tris-Base	58,0 g		
Glycin	29,0 g	10x Blotpuffer	100 ml
SDS	3,70 g	Methanol	200 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml
Blotentfärber:			
MeOH	100 ml		
Eisessig	20 ml		
H ₂ O	ad 200 ml		

2.5.7 Proteinfärbung

SDS-Gele und Blots wurden in dieser Arbeit mit Coomassie-Blau angefärbt. SDS-Gele wurden eine Stunde unter leichtem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung angefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung zunächst im Entfärber I für eine Dauer von 30 Minuten. Die vollständige Entfärbung des Hintergrundes sowie die weitere Aufbewahrung über mehrere Wochen erfolgte im Entfärber II. Zur Langzeitlagerung wurden die Gele in Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt. Die Blots wurden wie unter 2.5.6 beschrieben gefärbt und eingeschweißt. Sie konnten bis zum weiteren Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert werden.

Färbelösung

Coomassie Blau R-250, 1,0%ig (w/v)	25 ml	
Methanol	100 ml	
Eisessig	20 ml	
H ₂ O	ad 200 ml	
	EntfärberI	EntfärberII
Methanol	100 ml	10 ml
Eisessig	20 ml	14 ml
H ₂ O	ad 200 ml	ad 200 ml

2.5.8 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) ist eine wichtige Methode in der Proteomforschung. Sie verbindet zwei verschiedene elektrophoretische Trenntechniken miteinander und ermöglicht so eine umfassende Auftrennung und Analyse von Proteingemischen.

Die Proteine in einem Proteingemisch werden zuerst in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt. Der pI ist der pH-Wert, bei dem ein Protein keine Ladung mehr hat und somit im elektrischen Feld nicht wandert. Diese Technik wird isoelektrische Fokussierung (IEF) genannt. Die IEF wurde mit Hilfe eines immobilisierten pH-Gradienten auf einem Gelstreifen (IPG-Streifen) durchgeführt. In der zweiten Dimension wird mit den aufgetrennten Proteinen eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Proteine nach ihrer Molekülgröße getrennt werden (siehe 2.5.4).

Es wurde eine 2D-Gelelektrophorese mit dem Wehrsekret von verschiedenen Käferlarven durchgeführt, um die darin vorkommenden Enzyme zu identifizieren. Dazu wurde Wehrsekret mit Hilfe einer Glaskapillare gesammelt und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert. Etwa 10 µl Wehrsekret wurden mit 75 µl Rehydratisierungslösung A vermischt. Anschließend wurde 45 µl Rehydratisierungslösung B mit dem Ampholyten pH 3-10 (Firma BioRad) dazugegeben. Der gesamte Ansatz (125 µl) wurde in eine spezielle Kammer der Firma Biorad mit Spalten von 7 cm Länge pipettiert. In diese Spalten konnten maximal 125

μ l Probe eingefüllt werden.

Ein IPG-Streifen (Firma Biorad, 7 cm, pH 3-10, linear) wurde luftblasenfrei und mit der Gelseite nach unten in die mit Probe befüllte Spalte gelegt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Streifen mit Silikonöl überschichtet und 16 Stunden weiter inkubiert. Silikonöl verhindert eine Verdunstung der Probe. Das Gel quoll in dieser Zeit, so dass die Proteine ins Gel aufgenommen werden konnten.

Die Rehydratisierungslösungen A und B enthalten Harnstoff und Thioharnstoff, die Wasserstoffbindungen spalten und so eine Aggregation und Sekundärstrukturausbildung der Proteine verhindern. Triton ist eine Seife, die hydrophobe Wechselwirkungen unterbindet und die Löslichkeit der Proteine erhöht. DTT ist das reduzierende Reagenz und sorgt für die vollständige Reduzierung der Disulfidbrücken.

Die isoelektrische Fokussierung wurde in der LKB 2117-001 Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia) durchgeführt. Die IPG-Streifen wurden mit der Gelseite auf die Porzellanplatte gelegt. Mit Wasser getränkte Filterpapierstückchen stellten eine Verbindung zwischen dem Gel und den Elektrodendrähten her. Anschließend wurden die Streifen mit Silikonöl überschichtet, um eine Verdunstung zu vermeiden. Die Spannung wurde mit dem Power-supplier MultiDrive XL (Pharmacia) angelegt. In der ersten Phase wurde für 90 Minuten eine konstante Spannung von 250 V angelegt, die der Ausbildung des pH-Gradienten im Gelstreifen diente. In der zweiten Phase wurde die Spannung in einer Zeitspanne von drei Stunden von 250 V auf 3000 V erhöht.

Für die zweite Dimension, die SDS-PAGE, mussten die IPG-Streifen äquilibriert werden. Dazu wurden sie zuerst in 5 ml SDS-Äquilibrierungspuffer + DTT 15 Minuten leicht schüttelnd inkubiert, anschließend die IPG-Streifen leicht abgetropft und in 5 ml Äquilibrierungspuffer + Iodacetamid (alkyliert Thiolgruppen im Protein und verhindert eine Reoxidation) 15 Minuten leicht schüttelnd inkubiert. Vor der weiteren Benutzung wurden die IPG-Streifen wieder leicht abgetropft.

Es wurde ein SDS-Trenngel nach 2.5.4 gegossen. Statt des Sammelgels wurde der IPG-Streifen vorsichtig zwischen die Glasscheiben geschoben bis der Streifen vollen Kontakt zum Trenngel hatte. Die restlichen Freiräume wurden mit leicht abgekühlter 1%iger Agarose-Lösung, wie sie zur Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.4.9) benutzt wurde, aufgefüllt. Es wurde eine Spannung von 200 V mit abnehmender Stromstärke (Startwert 75 mA) für eine Dauer von 45 Minuten angelegt. Das fertige Gel wurde mit Coomassie-Blau angefärbt (siehe 2.5.7).

Rehydratisierungslösung A:

7 M Harnstoff	4,2 g / 10 ml
2 M Thioharnstoff	1,5 g / 10 ml
4% CHAPS	0,4 g / 10 ml

Alle Komponenten wurden in einem Falconröhrchen abgewogen und mit etwas dest. Wasser gelöst. Es wurden 50 mM DTT (500 μ l von Stammlösung (1M) = 1,54 g / 10 ml) dazugeben,

auf jeweils 10 ml mit dest. Wasser aufgefüllt und gut vermischt. Aliquots konnten bei -80°C gelagert werden.

Rehydratisierungslösung B:

Rehydratisierungslösung A	2,5 ml
Ampholytlösung (pH 3-10)	125 μl
Triton X 100	125 μl
Bromphenolblau	Spatelspitze

Die Lösungen wurden gut vermischt. Aliquots konnten bei -80°C gelagert werden.

SDS-Äquilibrationpuffer:

Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8)	6,7 ml
Harnstoff	72,07 g
SDS	4,0 g

Die einzelnen Komponenten wurden in etwas dest. Wasser gelöst und dann 87 g (entspricht 69 ml) Glycerol und eine Spatelspitze Bromphenolblau dazugegeben. Bromphenolblau zeigte den Fortlauf der Elektrophorese an. Mit dest. Wasser wurde auf 200 ml aufgefüllt. Aliquots konnten bei -80°C gelagert werden.

Zugabe von DTT (wird immer frisch angesetzt):

300 μl 1 M DTT-Lösung auf 20 ml SDS-Äquilibrationpuffer (entspricht der Menge für 4 IPG-Streifen).

Zugabe von Iodacetamid (wird immer frisch angesetzt):

0,56 g Iodacetamid auf 20 ml SDS-Äquilibrationpuffer (entspricht der Menge für 4 IPG-Streifen).

2.5.9 Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose

Die Immobilisierte Metall-Ionen Affinitäts-Chromatographie (IMAC) ist eine effektive Methode, Proteine in nur einem Schritt aufzureinigen. Sie wurde zum ersten Mal von Porath *et al.* (Porath *et al.*, 1975) eingesetzt und von Hochuli *et al.* (Hochulie *et al.*, 1987) durch die Entwicklung des neuen Liganden Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA) in ihrer Effizienz weiter optimiert. Dieser Ligand ist an Sepharose CL-6B gekoppelt und geht mit vier der insgesamt sechs koordinierenden Bindungsstellen von Ni^{2+} -Ionen stabile Interaktionen ein (Ni-NTA-Agarose, Qiagen/ Invitrogen). Die restlichen zwei Stellen der immobilisierten Ni^{2+} -Ionen stehen somit für die spezifische Interaktion mit Histidin-Resten von Proteinen zu Verfügung. Die Elution der gebundenen Proteine kann durch Protonierung der Histidin-Reste (Senkung des pH-Wertes) oder durch die kompetitive Verdrängung mit Imidazol (milde Variante) erfolgen.

Nach letzterem Prinzip wurde die in *E. coli* überexprimierte SAO aus *C. tremulae* aufgereinigt (siehe 3.2.5.2).

Gewinnung der rekombinanten Proteine

Es wurde eine Vorkultur angesetzt, indem 7 ml LB mit einer Dauerkultur angeimpft und mit dem dazugehörigen Antibiotikum 16 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Die Kultur wurde komplett abzentrifugiert, die LB-Reste vollständig entfernt und anschließend in 100 ml LB mit 200 µl Ampicillin bzw. Kanamycin (Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml) überführt. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 angezogen. Anschließend wurde zur Induktion 200 µl IPTG (Endkonzentration: 0,1 M) dazugegeben und 16 Stunden bei 37°C geschüttelt.

Die 100 ml Kultur wurde auf zwei 50-ml-Falconröhrchen aufgeteilt und 15 Minuten bei 4°C (Beckmann Zentrifuge, 3600 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen, das Bakterienpellet in je 3 ml Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde 15 Minuten bei 26°C und 140 rpm inkubiert, um die Zellen durch das im Lysispuffer enthaltene Lysozym zu lysieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit Ultraschall (Branson-Sonifier Cell Disruptor B15, Standard-Mikrotip-Spitze, Pulsiereinrichtung auf 50%) zehn Minuten homogenisiert. Die Abzentrifugation von Zelltrümmern bzw. nicht aufgeschlossenen Zellen erfolgte 30 Minuten bei 4°C (Beckmann Zentrifuge, 3600 rpm).

Lysispuffer:

NaH ₂ PO ₄	345 mg	50 mM
NaCl	876,6 mg	300 mM
Triton x 100	500 µl	1%
Lysozym	5 mg	100 µg/ml

Die Komponenten wurden in etwa 40 ml dest. H₂O gelöst, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und anschließend auf 50 ml mit dest. H₂O aufgefüllt.

Reinigung über Ni-NTA-Agarose

Die Reinigung der sechsfach Histidin-markierten Proteine erfolgte unter nativen Bedingungen modifiziert nach einem Protokoll der Firma Qiagen (The Qiaexpressionist 01/2000). Die Reinigung wurde mit äquilibrierter Ni-NTA-Agarose im großen als auch im kleinen Maßstab durchgeführt. Im folgenden werden beide Methoden beschrieben.

Der kleine Maßstab wurde in der Regel als Vorversuch durchgeführt. Zur Äquilibration wurden 50 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen oder Invitrogen) mit 1 ml Lysispuffer zur Äquilibration versetzt und vier Minuten bei 4°C (15.300 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut 1 ml Lysispuffer dazugegeben, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig und komplett entfernt.

Es wurden 2 ml des Proteinextraktes, das nach dem Sonifizieren durch Zentrifugation erhalten wurde, mit der äquilibrierten Ni-NTA-Agarose versetzt und eine Stunde bei 4°C auf dem end-over-end-Schüttler an die Matrix gekoppelt. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls bei 4°C durchgeführt.

Als Säule wurde eine 1000 μl -Pipettenspitze verwendet. Dazu wurde die Spitze abgeschnitten und ein wenig Watte in die so präparierte Spitze gesteckt und mit einem Tropfen Wasser angefeuchtet. Die an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine wurden auf die präparierte Pipettenspitze gegeben und der Durchlauf gesammelt. Anschließend wurde die Säule vier Mal mit 1,5 ml Waschpuffer und einmal mit 1,5 ml Lysispuffer gewaschen. Die Elution erfolgte fraktionsweise durch Zugabe von jeweils 500 μl Elutionspuffer. Der Lysispuffer zur Äquilibration als auch der Waschpuffer enthielten zur Reduzierung von unspezifischen Bindungen anderer Proteine an die Ni-NTA-Matrix bereits eine geringe Menge des späteren Elutionsmittels Imidazol.

Anschließend wurde aus jeder Fraktion ein Aliquot zur SDS-Gel-Analyse (siehe 2.5.4) entnommen und nachfolgend mit Coomassie (siehe 2.5.7) angefärbt.

Der große Maßstab wurde als Hauptversuch nach erfolgreichem Vorversuch durchgeführt. Im Anschluß konnte ein Enzymassay durchgeführt werden. Zur Äquilibration wurden 200 μl Ni-NTA-Agarose mit zweimal 5 ml Lysispuffer versetzt und zentrifugiert. Als Säule dienten leere PD10-Säulenhülsen mit Fritte. Statt 2 ml des Proteinrohextraktes wurden die kompletten 100 ml eingesetzt und wie im kleinen Maßstab behandelt.

Lysispuffer zur Äquilibration:

NaH ₂ PO ₄	1,725 g	50 mM
NaCl	4,383 g	300 mM
Imidazol	0,3404 g	20 mM
β -Mercaptoethanol	86,58 μl	5 mM

In 250 ml dest. H₂O lösen und mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

Waschpuffer:

Lysispuffer zur Äquilibration	50 ml	
NaCl	3,5 g	1,5 M

NaCl vollständig lösen und mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

Elutionspuffer:

Lysispuffer zur Äquilibration	50 ml	
Imidazol	783 mg	250 mM

Imidazol vollständig lösen und mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

2.5.10 Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der SAO

Die Aktivitätsbestimmung der SAO erfolgte über die Quantifizierung des Reaktionsproduktes Salicylaldehyd. Das rekombinante Protein, das auf Aktivität überprüft werden sollte, war im Rohextrakt enthalten, das nach 2.5.9 gewonnen und anschließend über PD10-Säulen auf

Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6) umgepuffert wurde (siehe 2.5.2). Ab Erhalt des Rohextraktes wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt, um die Aktivität des Enzyms zu erhalten.

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für zehn Minuten in einem temperierten Wasserbad bei 25°C in absolut dichten Autosamplergefäßen aus Glas und mit Deckel, die ein Septum enthielten (Firma neoLab). Die absolut dichten Reaktionsgefäße waren nötig, da das zu messende Reaktionsprodukt Salicylaldehyd flüchtig ist. Die Aktivitätsmessung wurde durch das Einfrieren der Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff abgestoppt. Alle Reaktionen wurden durch Enzymzugabe mittels einer Kanüle, die das Septum durchstechen konnte, gestartet.

Das Enzymassay wurde wie folgt angesetzt:

40 bis 49 μ l	50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 (Endkonzentration: 50mM)
50 μ l	Salicylalkohol (75 mM) (Endkonzentration: 37,5 mM)
1 bis 10 μ l	Enzymlösung (0,085 bis 0,850 μ g Protein)

Das Endvolumen betrug 100 μ l.

Das Substrat wie auch das Enzym wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 angesetzt.

Extraktion der Inkubationsansätze:

Die bei –80°C tiefgefrorenen Reaktionsansätze (100 μ l) wurden unter Verwendung einer Kanüle mit 30 μ l Chloroform versetzt. Zur besseren Extraktion wurde der Ansatz für 30 Sekunden auf einem Schüttler gut geschüttelt und dann zur Phasentrennung drei Minuten bei 5000 Upm (Sigma 201M Tischzentrifuge) zentrifugiert. Mittels der Kanüle wurde 1 μ l der organischen Phase abgenommen und zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt.

Als Standard wurden 2 mg/ml Salicylalkohol bzw. Salicylaldehyd jeweils in Chloroform gelöst und ebenfalls direkt zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt.

Die gaschromatographischen Analysen wurden mit dem Gerät von Carlo Erba Mega 5160 durchgeführt. Zur Trennung diente eine DB1-Säule (100% Methylsilikon) von 30 m Länge, einem Innendurchmesser von 0,32 mm und einer Phasendicke von 0,25 μ m. Der Probenauftrag wurde bei 60°C in einer on-column Injektion und einem Injektionsvolumen von 1,0 μ l durchgeführt. Es wurde mit einem linearen Temperaturgradient von 6°C/min bis 300°C gearbeitet. Die Detektion erfolgte mittels FID (Flammenionisationsdetektor), die Signale wurden durch einen Integrator (Shimadzu C-R3A Chrotopac) aufgezeichnet und integriert.

Ist bei den Inkubationsansätzen Salicylaldehyd entstanden, deutet dies auf ein SAO-Aktivität des rekombinanten Proteins hin.

2.5.11 Untersuchung der β -D-Glucosidase-Aktivität

β -D-Glucosidasen spalten Pyranoside, so dass Naphthol frei wird und mit Echtblausalz eine violette Verbindung eingeht. Diese Farbreaktion dient dem Nachweis der β -D-Glucosidase-Aktivität.

Es wurde frisch gemolkenes Wehrsekret verwendet, um darin die Aktivität einer β -D-Glucosidase nachzuweisen. Das Wehrsekret wurde mit dem Probenpuffer der nativen PAGE (siehe 2.5.5) versetzt, anschließend wurde eine native PAGE durchgeführt. Das Gel wurde in folgender Lösung 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert:

- 10 ml McIlvaine-Puffer (pH 5)
- 20 mg 6-Bromonaphthyl- β -D-Glucopyranosid
- 20 mg Diazoniumsalz (z. B. Echtblausalz B)
- Ca²⁺ - und Mg²⁺-Ionen

Die Reaktion wurde mit 7%iger Essigsäure gestoppt. Bei positivem Nachweis sollte sich der Gelbereich, in dem sich die β -Glucosidase befand, violett färben.

2.5.12 Deglykosilierung mit PNGase F

Die PNGase F (Peptide:N-Glycosidase F, aus *Flavobacterium meningosepticum*) von Bio-Labs ist eine Amidase, die alle N-Glykane eines Proteingerüsts abspalten kann. Mit diesem Enzym kann somit eine N-Glykosilierung eines Proteins in einem SDS-Gel nachgewiesen werden.

In Ammoniumsulfat gefälltes Wehrsekret wurde gelöst und umgepuffert (siehe 2.5.2) und die darin enthaltenen Proteine 16 Stunden mit TCA (siehe 2.5.3) gefällt. Anschließend wurde die Probe in Standardpuffer (siehe 2.5.4) aufgenommen. Ein Teil der Probe wurde mit PNGase F behandelt, der andere Teil wurde als unverdaute Probe aufbewahrt. Der Verdau wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Danach wurden die Proben wie unter 2.5.4 beschrieben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

2.5.13 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung wurde von Frau Getzlaff im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) durchgeführt. Es handelt sich um einen chemischen Abbau nach Edmann (Schrimpf, 2002). Zur Vorbereitung der Probe wurde diese auf ein SDS-Gel (siehe 2.5.4) aufgetragen und anschließend direkt auf eine Membran geblottet (siehe 2.5.6) und mit Coomassie gefärbt (siehe 2.5.7). Die zu untersuchende Bande wurde ausgeschnitten, mit dest. Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet und ins HZI geschickt. Es ist darauf zu achten, dass eine deutliche Bande zu erkennen ist, da sonst die Proteinmenge für eine Untersuchung nicht ausreicht.

2.5.14 MS/MS-Sequenzierung

Im Bereich der Proteomics hat die Massenspektrometrie (MS) einen hohen Stellenwert. Mit ihrer Hilfe können Peptide isoliert, identifiziert und analysiert werden. Die Electrospray ionization tandem mass spectrometry, kurz ESI-MS/MS, ist eine weit verbreitete und spezielle Methode.

Zuerst wird durch den Verdau des zu untersuchenden Proteins mit Trypsin ein Peptidgemisch erzeugt. Dieses Peptidgemisch wird durch ESI (Electrospray ionization) ionisiert. Anschließend wird das Gemisch in zwei hintereinander geschaltete Massenspektrometer gegeben. Im ersten Massenspektrometer kann aus dem Peptidgemisch ein Peptid zur weiteren Analyse isoliert werden. Im zweiten Massenspektrometer wird das Peptid fragmentiert. Die sogenannten Tochter-Ionen können getrennt und detektiert werden. Man erhält ein Fragmentierungsmuster, aus dem sich aufgrund der Massendifferenzen der Ionen die Aminosäuresequenz des Peptids herleiten lässt. Eine Massendifferenz von 71 weist z. B. auf Alanin hin, eine Differenz von 87 auf Serin. Isoleucin und Leucin sowie Lysin und Glutamin, die jeweils die gleiche Massendifferenz zeigen, lassen sich aus diesem Grund nicht voneinander unterscheiden. Ein weiterer Nachteil ergibt sich in der Unterscheidung von oxidiertem Methionin und Phenylalanin. Oxidiertes Methionin kommt häufig als Artefakt bei der 2D-Gelelektrophorese vor und hat die gleiche Masse wie Phenylalanin (Schrimpf, 2002).

Die Methode der ESI-MS/MS hat sich besonders bewährt für Proteine, die sich noch nicht in Datenbanken befinden. Diese *de novo* Sequenzierung unbekannter Proteine erlaubt den Vergleich der erhaltenen Aminosäuresequenz mit Datenbanken zur Erlangung von Informationen über eventuell vorhandene Homologien zu bekannten Proteinfamilien. Deren Eigenschaften können eventuelle Rückschlüsse auf das untersuchte Peptid geben. Die erhaltenen Peptidsequenzen können zudem als Vorlage für den Entwurf degenerierter Primer (siehe 2.4.1) dienen, um die DNA des gesuchten Proteins zu identifizieren und weiter analysieren zu können.

Mit Hilfe der ESI-MS/MS ist es ebenfalls möglich, Rückschlüsse auf eventuell vorhandene Modifikationen des Proteins, wie Glykosylierung oder Phosphorylierung, zu erhalten. Jede Modifikation führt zu einer Änderung der Molekülmasse und ist daher massenspektrometrisch nachweisbar. Modifizierte Peptide zeigen häufig ein charakteristisches Fragmentierungsverhalten, das es ermöglicht, sie von unmodifizierten Peptiden zu unterscheiden. Desweiteren ist es möglich, bei bekannter Aminosäuresequenz eines rekombinanten Proteins aus dem Vergleich zwischen der theoretischen Masse des rekombinanten Proteins und der Masse des nativen Proteins auf posttranslationale Modifikationen zu schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die MS/MS-Sequenzierung im HZI von Herrn Dr. M. Nimtz durchgeführt. Zur Gewinnung der Proteine wurde das Wehrsekret von *C. tremulae* wie in 2.2.1 beschrieben gesammelt und eine 2D-Gelelektrophorese (siehe 2.5.8), eine SDS-PAGE (siehe 2.5.4) oder eine native PAGE (siehe 2.5.5) durchgeführt. Die zu untersuchenden Spots wurden nach der Coomassie-Färbung des Gels mit Hilfe eines Skalpell aus-

ten, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit autoklaviertem Wasser drei Mal gewaschen. Die Gelstücke wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und zur weiteren Analyse ins HZI gegeben.

Im HZI wurden die Proteine mit Trypsin verdaut. Das daraus resultierende Peptidgemisch wurde nach einem Standardprotokoll extrahiert und aufgereinigt. Ein QTOF II Massenspektrometer (Micromass, Manchester, England) ausgestattet mit einer Nanopray Ionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protana, Odense, Denmark) wurde für die Elektrospray Ionisation mit anschließender MS der Peptide eingesetzt. Die Peptide wurden mit Hilfe eines Quadrupol Mass Analyzer in die Kollisionszelle geleitet, wo sie in Tochter-Ionen fragmentiert wurden (Kollisionsenergie 25-30 eV). Die Tochter-Ionen wurden in einem orthogonalen TOF (time-of-flight) Mass Analyzer getrennt. Die erhaltenen MS/MS Spektren wurden verstärkt (MAX Ent. 3; Micromass) und die Aminosäuresequenz abgelesen. Die Aminosäuresequenzen wurden mit Proteindatenbanken verglichen (siehe 2.4.15).

Kapitel 3

Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse zusammengefasst. Zu Beginn der praktischen Arbeit war nur Wehrsekret von *C. populi* vorhanden. Mit dem Wehrsekret wurde eine MS/MS-Sequenzierung durchgeführt. Die erhaltenen Peptidsequenzen zeigten Homologie zu einer bereits bekannten Enzymfamilie. Der Großteil der Versuche wurde mit Larven von *C. tremulae* durchgeführt. Käfer dieser Art und der nah verwandten Art *C. populi* wurden von Herrn Prof. Pasteels aus Brüssel erhalten und konnten erfolgreich vermehrt und über mehrere Jahre kultiviert werden (siehe 2.2.1). Weitere Versuche wurden mit Larven von *Ph. cochleariae* durchgeführt. Käfer und Larven von *Ph. cochleariae* wurden von Frau Dr. Burse aus Jena (MPI für Chemische Ökologie, Arbeitsgruppe Prof. Boland) zur Verfügung gestellt und über zwei Jahre kultiviert.

C. tremulae und *C. populi* gehören zur Gattung *Chrysomela*. Die Larven produzieren in einem Reservoir Salicylaldehyd mit Hilfe von drei Enzymen, die sich ebenfalls dort befinden (Daloze und Pasteels, 1994) und daher direkt aus dem Wehrsekret isoliert werden können. Die beteiligten Enzyme sind eine β -Glucosidase, eine Salicylalkohol-Oxidase (SAO) und eine Katalase. Die Synthese des Salicylaldehyds ist wirtspflanzenabhängig (siehe 1.1.2.2).

Ph. cochleariae gehört ebenfalls zur Gattung *Chrysomela*. Die Larven dieses Käfers produzieren in ihrem Reservoir Chrysomelidial. Dabei handelt es sich um ein methylcyclopentanoides Monoterpen, welches der Stoffgruppe der Iridoide angehört (Daloze und Pasteels, 1994). Die Enzyme, die diese Wehrsubstanz synthetisieren, sind vermutlich eine Glucosidase, eine Oxidase und eine Cyclase. Sie befinden sich im Wehrsekret und sollten daher daraus isoliert werden. Die Strategie von *Ph. cochleariae* ist autogen, also von der Wirtspflanze unabhängig (siehe 1.1.2.1).

Brückmann (Brückmann, 2002) konnte in seiner Arbeit bereits die SAO aus *C. populi* und *Ph. vitellinae* teilreinigen und biochemisch charakterisieren. Die SAO Untereinheiten haben eine Größe von 80 kDa (*C. populi*) und 79 kDa (*Ph. vitellinae*). Das native Molekulargewicht der SAO aus *Ph. vitellinae* wurde auf 334 kDa bestimmt, was zu der Annahme führt, dass es sich bei der Oxidase um ein Tetramer handelt. Die Sequenzdaten von Peptiden von *C. populi* aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) wurden in dieser Arbeit in

PCR-Versuchen mit *C. tremulae* verwendet. *C. populi* und *C. tremulae* sind nah miteinander verwandt. Es wurde vermutet, dass die für die SAO codierenden cDNA-Sequenzen der beiden Arten sehr ähnlich sind. Die Versuche führten zu keinem Erfolg, so dass die SAO direkt aus *C. tremulae* isoliert und ansequenziert wurde.

Mit Hilfe der MS/MS-Sequenzierung konnten Peptide aus dem Wehrsekret der zu untersuchenden Arten sequenziert werden. Auf Grundlage der Peptidsequenzen wurden degenerierte Primer entworfen und diese in PCR-Versuchen eingesetzt.

3.1 Sequenzierung von Peptiden

Die MS/MS-Sequenzierung ist im Bereich der Proteomics eine weit verbreitete Methode, da mit ihrer Hilfe Peptide direkt isoliert, identifiziert und sequenziert werden können. Alle Enzyme, die an der Wehrsekretbildung der *Chrysomela*-Arten beteiligt sind, befinden sich im Wehrsekret und sind somit extrazellulär, so dass eine Auftrennung der im Wehrsekret enthaltenen Proteine den direkten Zugang zu den Enzymen ermöglichen sollte. Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden direkt zum Entwurf degenerierter Primer verwendet und in PCR-Versuchen eingesetzt. Lagern sich die degenerierten Primer wie vorgesehen an die Template-DNA an, entsprechen die amplifizierten PCR-Produkte cDNA-Sequenzen, die für Proteine aus dem Wehrsekret codieren.

In dieser Arbeit wurden die Wehrsekrete von *C. populi* und *C. tremulae* mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und der SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich zur MS/MS-Sequenzierung wurde eine N-terminale Sequenzierung der SAO aus *C. tremulae* durchgeführt.

3.1.1 2D-Elektrophorese des Wehrsekrets von *C. populi*

Es wurde eine 2D-Elektrophorese des Wehrsekrets von *C. populi* zur Trennung der darin enthaltenen Enzyme durchgeführt. Diese Art produziert wie *C. tremulae* Salicylaldehyd und lebt auf Pappeln. *C. populi* ist schwer von *C. tremulae* zu unterscheiden. *C. populi*-Käfer sind etwas größer und weisen an den Enden der Flügeldecken einen kleinen schwarzen Fleck auf (Dierl, 2001). Die Larven sind nicht voneinander zu unterscheiden, jedoch sind die Eier von *C. populi* braun während die von *C. tremulae* gelb sind (siehe Abbildung 3.1). Das Wehrsekret von *C. populi* wurde von Herrn Prof. Pasteels aus Brüssel zur Verfügung gestellt und war in Ammoniumsulfat gefällt. Die Arbeiten wurden mit dem Wehrsekret dieser Art begonnen, da zu diesem Zeitpunkt kein Wehrsekret von *C. tremulae* vorlag. Zudem lagen bereits Daten aus *C. populi* aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) vor.



Abbildung 3.1: *C. populi*. Links: braune Eier (Foto: S. Augustin). Rechts: Käfer mit schwarzem Fleck an den Enden der Flügeldecken (Foto: H. Tanner).

Die Probe wurde wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben aufgearbeitet. Dann wurde eine 2D-Elektrophorese mit dem TCA gefällten Wehrsekret (siehe 2.5.8) durchgeführt. Abbildung 3.2 zeigt vier Spots auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel, die wie auf einer Perlenkette aufgereiht nebeneinander liegen.

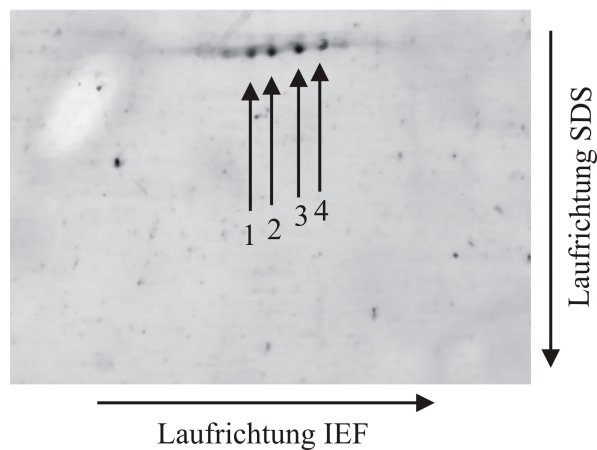


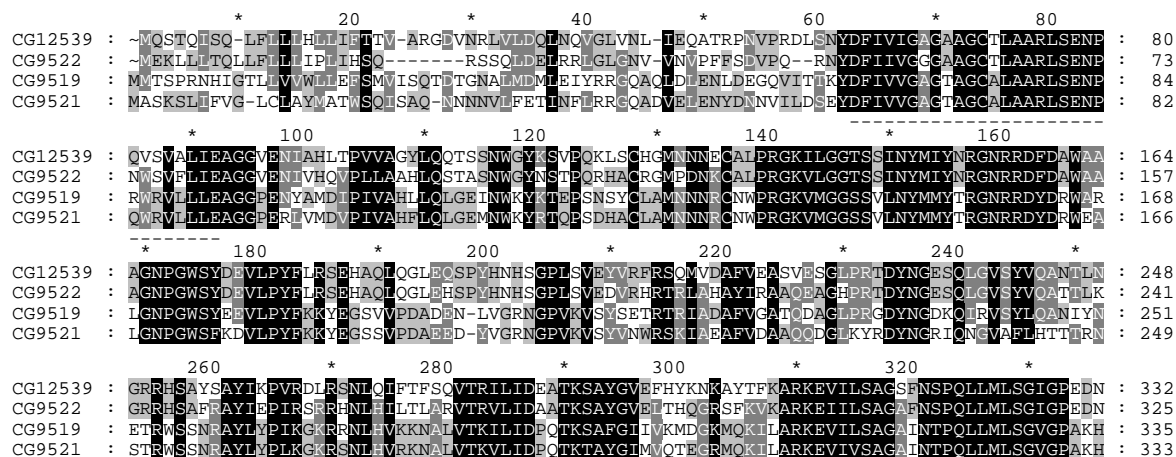
Abbildung 3.2: 2D-Elektrophorese aus dem Wehrsekret von *C. populi*. Die mit 1-4 gekennzeichneten Spots wurden ausgeschnitten und sequenziert.

Jeder Spot wurde einzeln ausgeschnitten, mit Wasser gewaschen, getrocknet und zur MS/MS-Sequenzierung ins HZI geschickt. Die Sequenzierung der einzelnen Gelspots zeigte, dass einige Peptide wiederholt in den verschiedenen Gelspots auftauchten. Dies machte deutlich, dass es sich bei den Gelspots jeweils um das gleiche Protein handelte. Gründe für die Aufspaltung sind nicht festgestellt worden. Vier Peptide sind eindeutig sequenziert, die somit alle aus einem Protein stammen:

1. Peptid: ASQEAGLPYVDNDGQNQLGVS(YVQTTTK)
2. Peptid: GFL(TSSNTVEALSULK)
3. Peptid: LSGDLSSLLNLSSR
4. Peptid: QLGLTVQSDLPV(GK)

Die Aminosäuren L und I können mittels MS/MS-Sequenzierung aufgrund ihrer gleichen Masse grundsätzlich nicht unterschieden werden (siehe 2.5.14). Deshalb bedeutet L immer L oder I. Die in Klammern gesetzten Aminosäuren sind nicht eindeutig sequenziert, da die Qualität einer MS/MS-Sequenzierung immer vom Fragmentierungsverhalten des jeweiligen Peptids abhängt. Bei schwachen Fragmentationen erhöht sich die Fehlerwahrscheinlichkeit, so dass nur Sequenzbereiche mit guter Signalqualität als eindeutig sequenziert zu betrachten sind.

Die Sequenz des ersten Peptids zeigte bei einem Datenbankvergleich mit BLAST (siehe 2.4.15) Homologie zu folgenden Sequenzen: CG9522 (RE36204p), CG12539 (RE49901p), CG9519 (GH23626p) und CG9521. Diese Proteine stammen alle aus dem Genomprojekt von *Drosophila melanogaster*. Sie gehören zur Enzymfamilie der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen (GMC). Die Familie der GMC beschreibt eine homologe Gruppe von Proteinen, die verschiedene katalytische Aktivitäten zeigen (Cavener, 1992). Diese Gruppe wurde beim Vergleich einer Glucose-Dehydrogenase von *Drosophila melanogaster*, einer Cholin-Dehydrogenase von *Escherichia coli*, einer Glucose-Oxidase von *Aspergillus niger* und einer Methanol-Oxidase von *Hansenula polymorpha* entdeckt. In allen Fällen handelt es sich um Flavoproteine, die am N-Terminus eine charakteristische FAD-Bindungsstelle haben, die im Vergleich mit anderen Flavoproteinen nur bei den Enzymen der GMC-Gruppe vorkommt. Es wurde ein Alignment der vier oben genannten homologen Sequenzen erstellt (siehe Abbildung 3.3). Mit Hilfe eines Alignments können verschiedene Sequenzen untereinander so dargestellt werden, dass Bereiche, die eine Homologie zeigen, untereinander zu liegen kommen und graphisch hervorgehoben werden können. Auf diese Weise wird ein direkter Vergleich der Sequenzen möglich.



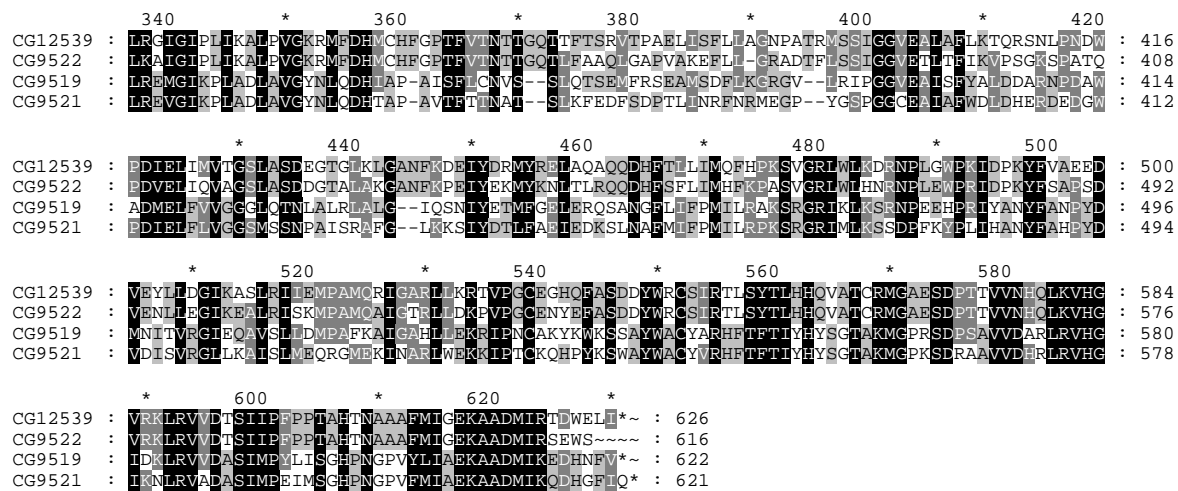


Abbildung 3.3: Alignment verschiedener GMCs. Die FAD-Bindungsstelle ist unterstrichen.

Das dritte Peptid bestätigt einen Teil der Aminosäuresequenz des N-Terminus, die im Rahmen der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) aus der SAO von *C. populi* sequenziert wurde. Der sequenzierte N-Terminus von Brückmann und das in dieser Arbeit erhaltene Peptid sind, mit Ausnahme von L und I, hundertprozentig identisch. Das zweite und das vierte Peptid weisen keine Homologie bei Datenbankvergleichen mit BLAST auf (siehe 2.4.15).

Da alle durch die 2D-Elektrophorese erhaltenen Peptide aus einem Protein stammen und ein Peptid eindeutig durch die Übereinstimmung mit einem Peptid aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) der SAO zugeordnet werden konnte, handelt es sich vermutlich bei allen Peptiden um Teile aus der gesuchten SAO. Zusätzlich weist die gefundene Homologie zu der Enzymfamilie der GMCs auf eine Alkoholoxidase hin (siehe 4.1), die der Aktivität der SAO entspricht (Brückmann, 2002).

Desweiteren wurde durch die MS/MS-Sequenzierung eindeutig ein Glykopeptid identifiziert, von dem ein Glykan folgende Zusammensetzung besitzt: Hexose-*N*-Acetylhexosamin. Die zugehörige Peptid-Sequenz konnte nicht zugeordnet werden, da bei Glykopeptiden die zuckerspezifischen Fragmentionen dominieren.

Aufgrund der Zuordnung der vier oben genannten Peptide zur SAO und der Homologie zu der Enzymfamilie der GMC wurde mit Hilfe des ersten Peptids ein degenerierter Primer P01 entworfen (siehe 2.4.1). Mit P01 und Oligo(dT) (siehe Anhang B) wurden verschiedene PCR-Versuche durchgeführt. Als DNA-Vorlage wurde allerdings nicht die mRNA von *C. populi* umgeschrieben, sondern die von *C. tremulae*, da zu diesem Zeitpunkt nur von dieser Art Larven vorhanden waren. PCR-Amplifikate wurden mit diesen Primern nie erhalten. Im späteren Verlauf der Arbeiten zeigte sich, dass der auf Basis des Peptids von *C. populi* entworfene degenerierte Primer im nicht konservierten Bereich der Sequenz von *C. tremulae* lag (siehe 3.2.4). Da zu diesem Zeitpunkt nicht klar war, inwieweit sich die Proteinsequenzen der SAO in den zwei nah verwandten Arten *C. populi* und *C. tremulae* voneinander

unterscheiden, wurden weitere Versuche mit den Larven von *C. tremulae* durchgeführt, da *C. tremulae* in ausreichender Zahl vorhanden war. Mit Hilfe des Wehrsekrets konnte eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt werden (siehe 3.2.1). Im späteren Verlauf der Arbeit war es möglich Käfer und Larven von *C. populi* zu erhalten, so dass auch aus *C. populi* mit Hilfe degenerierter Primer eine hypothetische SAO identifiziert werden konnte (siehe 3.2.5.4).

3.2 Identifizierung von SAO codierenden cDNAs aus *C. tremulae*

Mit Hilfe degenerierter Primer, die auf Grundlage eines Peptids aus einer N-terminalen Sequenzierung entworfen wurden (siehe 3.2.1), wurde eine erste mögliche SAO codierende cDNA-Sequenz aus *C. tremulae* erhalten. Da das Peptid eindeutig der SAO zugeordnet werden konnte (siehe 3.2.1), handelt es sich bei der aus *C. tremulae* erhaltenen Sequenz SAO01.kurz um eine SAO codierende cDNA-Sequenz. SAO01.kurz zeigte zudem eine Homologie zu den bereits bekannten GMCs, von denen einige wie die SAO eine Alkoholoxidase-Aktivität aufweisen (siehe 4.1).

3.2.1 Entwurf degenerierter Primer mit Peptiden aus N-terminaler Sequenzierung aus dem Wehrsekret von *C. tremulae*

Aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) ist bekannt, dass die gesuchte SAO eine Größe von etwa 80 kDa hat. Da die Größe der SAO bekannt war, konnte aus einem Blot die SAO aus *C. tremulae* isoliert und eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt werden. Die erhaltene Peptidsequenz ist somit Teil der SAO. Die Peptidsequenz wurde als Grundlage für den Entwurf degenerierter Primer verwendet, die zur Identifizierung der die SAO codierende cDNA führten.

Etwa 50 μ l Wehrsekret von *C. tremulae* wurde mit Hilfe einer Glaskapillare gesammelt und in eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung geblasen (siehe 2.2.1). Diese Lösung wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

Das gefällte Wehrsekret wurde umgepuffert, aufkonzentriert und entsalzt (siehe 2.5.2), mit TCA gefällt (siehe 2.5.3), in 10 μ l Probenpuffer aufgenommen und auf ein 12%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen (siehe 2.5.4). Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie gefärbt (siehe 2.5.6).

Die Bande, die einer Größe von etwa 80 kDa entsprach, wurde mit einem Skalpell aus dem Blot ausgeschnitten und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Probe zur N-terminalen Sequenzierung ins HZI geschickt (siehe 2.5.13).

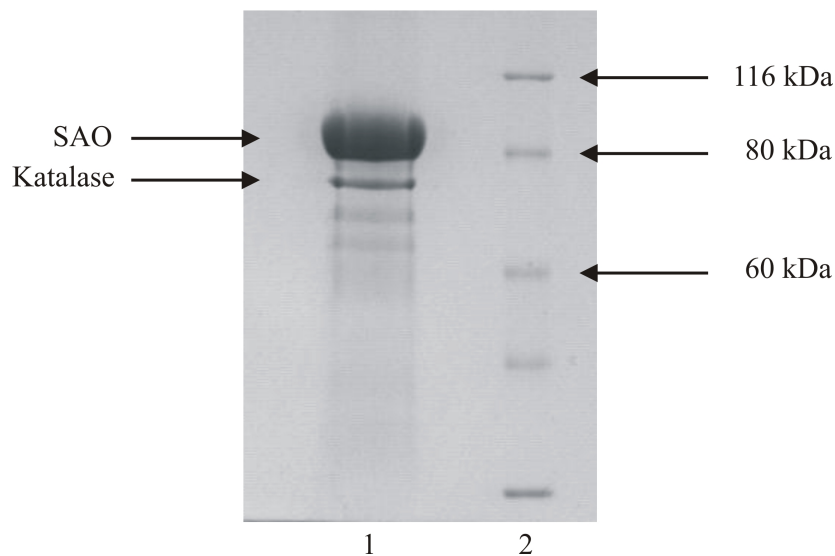


Abbildung 3.4: SDS-PAGE aus dem frischen Wehrsekret von *C. tremulae*. 1 Wehrsekret. 2 Markerproteine in kDa.

Die Sequenzierung ergab den N-Terminus des Proteins und hatte eine Länge von 15 Aminosäuren:

LYDEFTGDISRFL(L)N

Die in Klammern gesetzte Aminosäure L ist nicht sicher sequenziert. Es kann sich auch um ein I handeln.

Auf Grundlage dieses Peptids wurde der degenerierte Primer P02 (siehe Anhang B) entworfen, der eine Länge von 23 Basen hatte und 512fach degeneriert war (siehe 2.4.1).

3.2.2 Probleme bei der RNA-Isolierung und RT-PCR

Mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden erfolgte die Gesamt-RNA-Isolierung aus den Larven von *C. tremulae*: RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) und TRIZOL®Reagenz (Invitrogen) (siehe 2.4.2). Die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Plant Mini Kit wurde mit bei -80°C eingefrorenen Tieren durchgeführt und die RNA zur Reversen Transkription eingesetzt. Gelchecks der RNA ergaben meist eine zum großen Teil degradierte RNA, so dass die anschließende RT-Reaktion und PCR nicht zum Erfolg führten. Ursache für die Degradierung der RNA könnte auch das Einfrieren der Larven bei -80°C sein.

Als weitere Ursache der RNA-Degradierung wurde vermutet, dass durch die RNA-Isolierung und der damit verbundenen Zerstörung der Drüsen die RNA mit dem Salicylaldehyd des Wehrsekrets interagiert, so dass weitere RNA-Moleküle vernetzt wurden und eine RNA-Isolierung aus den Drüsen verhindert wurde. Daher wurden vor der RNA-Isolierung mit dem TRIZOL®Reagenz die lebenden Tiere über mehrere Tage mit Hilfe von Filterpapier oder Glaskapillaren gemolken, so dass kein Wehrsekret mehr in den Drüsen vorhanden war. Es wurden Larven verwendet, die groß genug waren, um leicht gemolken zu werden, aber

die noch keine Anzeichen einer Verpuppung zeigten. Diese Larven wurden nach drei Tagen Melkzeit in Stickstoff getötet, und anschließend sofort die RNA isoliert. Ein Gelcheck der RNA wies auf keine Degradierung hin. Nach der RNA-Isolierung wurde sofort mit der cDNA-Synthese begonnen. Gelagerte RNA war meist soweit degradiert, so dass die PCR mit dieser DNA zu keinem Ergebnis führte.

3.2.3 Von der cDNA zur Gesamt-Sequenz

Die Reverse Transkription war mit der Superscript®III von Invitrogen bei 55°C erfolgreich (siehe 2.4.7). Die daran anschließende PCR wurde mit dem N-terminalen Primer P02 und dem Oligo(dT)-Primer durchgeführt (siehe Anhang B). In anfänglichen Versuchen wurden in der Reversen Transkription als auch im PCR-Ansatz 1-2 µl einer 10 pmol/µl Oligo(dT)-Lösung verwendet. Die anschließenden Sequenzierungen der PCR-Amplifikate ergaben, dass der Oligo(dT)-Primer sich sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende unspezifisch anlagerte. Eine Reduzierung der Konzentration des Oligo(dT)-Primers auf ein Zehntel (1 pmol/µl) sowohl bei der Reversen Transkription als auch bei der PCR verhinderte diese unspezifische Anlagerung.

Im Laufe diverser PCR-Ansätze wurden vier Polymerasen ausprobiert: *Taq*-DNA-Polymerase (rekombinant) und *Pfx*-DNA Polymerase von Invitrogen; *Pfu*-DNA Polymerase von Promega und die AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma. Nur die AccuTaq LA DNA Polymerase führte bei der Amplifizierung der SAO und allen folgenden PCR-Ansätzen zu einem Ergebnis. AccuTaq LA DNA Polymerase kombiniert eine thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase mit einer zweiten thermostabilen Polymerase, die Proofreading-Aktivität besitzt. Proofreading-Aktivität bedeutet, dass die Polymerase in der Lage ist, falsch eingebaute Basen zu erkennen und durch richtige zu ersetzen. Dies ermöglicht im Gegensatz zu normalen *Taq*-DNA-Polymerasen die Amplifizierung von PCR-Produkten, die bis zu 20 kb enthalten.

Auf der Suche nach der SAO wurde in einer PCR der Primer P02 als Forward-Primer und Oligo(dT) als Reverse-Primer eingesetzt. Annealing-Temperaturen von 66, 1°C und 66, 8°C ergaben jeweils eine Bande mit etwa 1600 Basenpaaren. Es war zu beobachten, dass Annealing-Temperaturen, die um wenige Grad ober- bzw. unterhalb dieser Temperaturen lagen, keine Banden ergaben. In Abbildung 3.5 wird der Einfluss der Annealingtemperatur besonders deutlich. Während in Spur 4 und 5 deutlich eine Bande zu sehen ist, fehlt sie in den anderen Spuren.

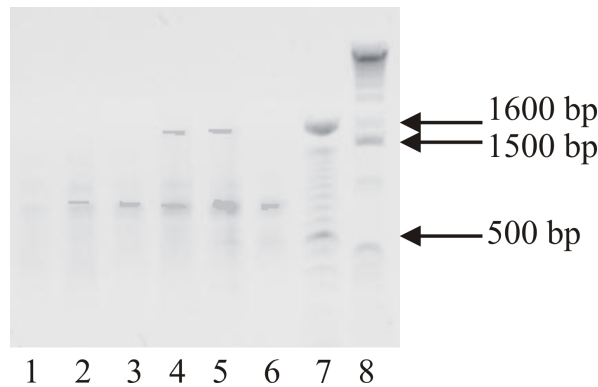


Abbildung 3.5: PCR mit AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma mit verschiedenen Anneling-Temperaturen: 1: 65, 0°C. 2: 65, 1°C. 3: 65, 7°C. 4: 66, 1°C. 5: 66, 8°C. 6: 67, 7°C. 7: 100 bp-Leiter (Fermentas). 8: 1 kb-Leiter (Fermentas).

Die etwa 1600 bp große Bande wurde in TOPO[®]-TA kloniert und dann in TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.4.10.1, 2.4.11). Nach der Transformation wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt (siehe 2.4.5.1). Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wurden die Plasmide mit *EcoRI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.4.12). Einer der Plasmide, bei denen die Transformation erfolgreich war, wurde sequenziert (siehe 2.4.14).

Die Sequenzierung ergab eine cDNA-Sequenz, die am 5'-Ende den Primer P02 und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz enthielt und somit 1903 Basen lang war. Wurde die Nukleinsäuresequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt und zur Sequenzanalyse mit Datenbanken verglichen, wies die erhaltene Aminosäuresequenz zu den bereits bekannten GMCs über 50% Identität auf. Die Homologie begann mit der hoch konservierten FAD-Bindungsstelle, die als gemeinsames Merkmal der GMCs identifiziert wurde (Cavener, 1992).

Da die SAO vermutlich der Familie der GMCs zugeordnet werden kann und das sequenzierte Konstrukt homolog zu den GMCs ist, wurde die erhaltene Sequenz mit Hilfe der 5'-RACE (siehe 2.4.8.4) vervollständigt. Da durch Verwendung des Oligo(dT)-Primers das 3'-Ende der gesuchten cDNA erhalten wurde, ist das 3'-Ende bereits bekannt und eine 3'-RACE nicht nötig.

Unter Verwendung des GSP1-Primers P06 wurde die cDNA synthetisiert (siehe 2.4.8.4). In der ersten PCR wurde P07 (GSP2) und AAP, in der nested PCR P08 (GSP3) und AAP verwendet (siehe Anhang B). Die erhaltene 400 bp große Bande wurde wiederum in TOPO[®]-TA kloniert und dann in TOP10-Zellen transformiert. Die Sequenzierung eines erfolgreich transformierten Klons ergab das 5'-Ende der gesuchten cDNA.

Tabelle 3.1: PCR-Bedingungen zum Erhalt der Sequenz SAO01.kurz

	Mittelstück + 3'-Ende	5'-Ende	
PCR-Programm	Standard-PCR konstant	Standard-PCR konstant	nested konstant
Taq-Polymerase	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)
Annealing-Temperatur	66, 1°C	62, 1°C	66, 1°C
Primer	P02 + Oligo(dT)	P07 + AAP	P08 + AAP
Bandengröße	1600 bp	ca. 500 bp	400 bp
Klonierung	TOPO [®] -TA		TOPO [®] -TA

Die Sequenzanalyse des 5'-RACE-Fragmentes ergab im hinteren Bereich eine ca. 145 bp lange Sequenzidentität zum Mittelstück und 3'-Ende, so dass die Sequenzen zusammengefügt werden konnten. Diese Sequenz wird im Folgenden SAO01.kurz genannt. Die Nukleinsäuresequenz wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt. Durch SignalP3.0 und PSORT (siehe 2.4.15) wurde ein Signalpeptid vorhergesagt, das mit Methionin als Startcodon beginnt und 21 Aminosäuren lang ist. Dem Signalpeptid folgt der durch die Sequenzierung bekannte N-Terminus der Sequenz (siehe 3.2.1). Alle Aminosäuren des N-Terminus von SAO01.kurz und der aus der N-terminalen Sequenzierung bekannte N-Terminus sind identisch. Der nicht codierende Teil der Sequenz am 5'-Ende ist 20 Basen lang. SAO01.kurz hat ab dem Signalpeptid bis zum ersten Stoppcodon eine Länge von 525 Aminosäuren bzw. 1575 Basen, das vorhergesagte Molekulargewicht der Proteinuntereinheit beträgt 59 kDa.

3.2.4 Vergleich mit Datenbanken

Die Sequenzanalyse von SAO01.kurz auf Aminosäureebene mit verschiedenen Datenbanken ergab eine Homologie mit den GMCs (siehe 2.4.15). In einem Alignment wurde die vorliegende Sequenz mit den GMC-Sequenzen verglichen, die zum ersten Mal einen Hinweis gaben, dass die SAO möglicherweise mit den GMCs homolog ist (siehe 3.1.1): CG9522 (RE36204p), CG12539 (RE49901p), CG9519 (GH23626p) und CG9521. SAO01.kurz zeigt auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 55% zu CG9522 aus *Drosophila melanogaster*. Zu den homologen Bereichen gehört die FAD-Bindungsstelle, die sich im Bereich der 60. Aminosäure der GMC-Sequenzen befindet und eine charakteristische Sequenz innerhalb der GMCs ist (siehe 4.1). Weiterhin sind mehrere hoch konservierte Bereiche der GMC-Sequenzen auch in SAO01.kurz zu finden. Dies deutet auf eine enge Verwandtschaft von SAO01.kurz zur Enzymfamilie der GMCs.

Die SAO01.kurz-Aminosäuresequenz zeigte mit den bereits bekannten Peptiden aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) keine vollständige Identität. Im Vergleich mit anderen GMC-Sequenzen befinden sich diese Peptide jedoch in den nicht konservierten Bereichen der Sequenzen. Ein Vergleich der N-terminalen Sequenzen von SAO01.kurz aus C.

tremulae und aus *C. populi* (aus (Brückmann, 2002)) ergab eine Sequenzidentität von 60%.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von SAO01.kurz mit denen anderer GMCs weist zwei Auffälligkeiten auf:

1. Die Sequenz SAO01.kurz ist im codierenden Bereich um etwa hundert Aminosäuren kürzer als die der anderen GMCs. Der offene Leserahmen (ORF) der SAO01.kurz hat bis zum ersten Stoppcodon eine Länge von 525 Aminosäuren während die ORFs der GMCs von *Drosophila melanogaster* über 600 Aminosäuren aufweisen.
2. Nach der Aminosäure 525 (L) erfolgt ein Stopp. Wird die Sequenz jedoch in dem Leserahmen weitergelesen, in den man durch Hinzufügen einer Base vor dem Stoppcodon gelangt, so entfällt das Stoppcodon. Dahinter ist eine Identität der Sequenz von 69% bis zum Stopp der *Drosophila*-Sequenzen feststellbar.

Diese Auffälligkeiten führen zu drei Hypothesen, warum die Sequenz SAO01.kurz kürzer ist als andere GMC-Sequenzen:

1. Hypothese: Der frühe Stopp in der Sequenz von SAO01.kurz kann durch Mutation nach Genduplikation entstanden sein. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein Pseudogen (siehe 4.2), welches sich in mindestens einer Base von der tatsächlich aktiven SAO codierenden cDNA unterscheidet.
2. Hypothese: Der frühe Stopp kann auf einen Lesefehler der *Taq*-DNA-Polymerase oder einen Sequenzierfehler zurückzuführen sein.
3. Hypothese: Die Sequenz SAO01.kurz ist tatsächlich so kurz. Für die Aktivität der SAO ist der hintere Teil der Sequenz nicht mehr nötig.

Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Site-directed-mutagenesis (siehe 2.4.8.5) eine Base in die Sequenz von SAO01.kurz eingefügt, so dass nach der 525. Aminosäure kein Stoppcodon folgt. Die lange mutierte Sequenz mit einer hohen Homologie zu den *Drosophila*-Sequenzen wurde SAO01.lang genannt.

Alle anschließenden Versuche wurden parallel mit der kurzen und der langen Sequenz durchgeführt. Läge ein Lesefehler der *Taq*-DNA-Polymerase oder einen Sequenzierfehler vor, ist es möglich, dass die lange Sequenz in einem Enzymassay Aktivität zeigt. Zeigt die kurze Sequenz Aktivität, würde die dritte Hypothese zutreffen und die kurze Sequenz die aktive SAO sein. Zeigen beide Sequenzen keine Aktivität, könnte die erste Hypothese zutreffen und SAO01.kurz ein Pseudogen darstellen. Beide Sequenzen wurden in *E. coli* exprimiert. Die exprimierten Proteine wurden im Enzymassay auf ihre Aktivität untersucht. Die Durchführung des Enzymassays und das Ergebnis werden in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben.

3.2.5 Charakterisierung der cDNA-Sequenz der SAO aus *C. tremulae*

Mit Hilfe der PCR ist es gelungen aus *C. tremulae* eine den GMCs homologen Aminosäuresequenz zu identifizieren (SAO01.kurz). Die Identität der GMC-Sequenzen mit der

SAO01.kurz-Sequenz im Bereich der hoch konservierten Abschnitte weist darauf hin, daß SAO01.kurz mit den GMCs verwandt ist (siehe 3.2.4). Die Hypothesen, die in Kapitel 3.2.4 aufgestellt wurden, sollen im Folgenden auf verschiedenen Wegen untersucht werden.

3.2.5.1 Site-directed-mutagenesis

Mit Hilfe der Site-directed-mutagenesis (siehe 2.4.8.5) wurde in die Sequenz von SAO01.kurz eine Base eingefügt, so dass nach der 525. Aminosäure kein Stoppcodon mehr folgt, sondern die Sequenz auf Aminosäureebene eine Länge von insgesamt 623 Aminosäuren hat. Diese Sequenz wurde SAO01.lang genannt und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 69 kDa. Vergleicht man diese Sequenz mit anderen GMC-Sequenzen, ist auch nach der künstlich veränderten 525. Aminosäure eine Sequenzidentität von 69% feststellbar.

Als Vorlage für die PCR (siehe 2.4.8.5) wurde die Plasmid-DNA der SAO01.kurz, die mit Hilfe der Expressionsprimer P09 und P10 erhalten wurde (siehe 3.2.5.2), verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit dest. Wasser 1:1000 verdünnt und anschließend in einer PCR mit den Site-directed-mutagenesis-Primern P37 und P38 (je 1 μ l der 10 pmol/ μ l-Lösung) eingesetzt (siehe Anhang B). Das PCR-Temperaturprogramm sah wie folgt aus:

konstantes Temperaturprogramm

94°C	2 min, dann Pause
Pause	
94°C	30 s
53°C	1 min
68°C	12 min
Wdh.	18 x
68°C	10 min
15°C	∞

Als Polymerase wurde die *Pfu*-DNA Polymerase von Promega eingesetzt. Es wurden 2,5 μ l 10xPCR-Puffer und je 0,5 μ l dNTP-Mix und *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet und mit dest. Wasser auf 25 μ l aufgefüllt.

Der PCR-Ansatz wurde nach der PCR eine Stunde bei 37°C mit *DpnI* verdaut und anschließend in TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.4.11). Als Antibiotikum wurde Kanamycin verwendet, da die Plasmid-DNA von SAO01.kurz in den pCR®XL-TOPO®-Vektor kloniert wurde und dieser eine Kanamycin-Resistenz besitzt (siehe 2.3).

Nach der Transformation wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt (siehe 2.4.5.2). Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wurden die Plasmide mit *EcoRI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.4.12). Zur Kontrolle der Mutation wurde eines der Plasmide, bei denen die Transformation erfolgreich war, sequenziert (siehe 2.4.14).

Anschließend wurde die Probe zusammen mit SAO01.kurz wie unter 3.2.5.2 beschrieben weiterbearbeitet.

3.2.5.2 Proteinexpression und Reinigung

SAO01.kurz und SAO01.lang werden im Folgenden parallel aufgearbeitet und zur Expression gebracht, um die unter 3.2.4 beschriebenen Hypothesen zu untersuchen. Der verwendete Vektor inklusive Schnittstellen ist der gleiche.

Die Klonierung von SAO01.kurz und SAO01.lang in den pET-22b(+)-Expressionsvektor erfolgte unter Einfügung von *NdeI*- und *SalI*-Schnittstellen durch eine PCR mit den Primern P09 (*NdeI*) und P10 (*SalI*) (siehe 2.4.10.2, Anhang B). Der Vektor wurde mit *NdeI* und *XhoI*, die Plasmid-DNA von SAO01.kurz und SAO01.lang mit *NdeI* und *SalI* geschnitten. *SalI* und *XhoI* sind kompatibel, d. h., dass die Restriktionsenzyme den gleichen Basenüberhang erzeugen und der Vektor mit der geschnittenen DNA somit ligiert werden kann. Da SAO01.kurz bzw. SAO01.lang intern eine *XhoI*-Schnittstelle enthalten, konnten sie nicht mit *XhoI* geschnitten werden. Als Ersatz wurde *SalI* verwendet.

In allen Fällen wurde das Signalpeptid des Proteins, wie es durch SignalP3.0 und PSORT (siehe 3.2.3) vorhergesagt wurde, vor der Expression entfernt, da im funktionellen Enzym im Insekt auch kein Signalpeptid vorhanden ist. Desweiteren ist aus der Arbeit von Naumann (Naumann, 2003) bekannt, dass die Expression eines Proteins in *E. coli* mit Signalpeptid deutlich niedrigere Proteinausbeuten liefert als eine Expression ohne Signalpeptid. Gründe hierfür sind möglicherweise hydrophobe Bereiche innerhalb der Signalsequenz, etwa durch die Assoziierung mit oder ohne Einlagerung in lebenswichtige Membransysteme. Nach Tobias *et al.* (Tobias *et al.*, 1991) können außerdem spezielle Aminosäuren, die dem Startcodon folgen, die Stabilität eines Proteins beeinflussen. Bei Proteinen, die nach dem Startcodon die Aminosäuren Arginin, Lysin, Phenylalanin, Leucin, Tryptophan oder Tyrosin enthalten, beträgt die Halbwertszeit des Proteins nur zwei Minuten. In SAO01.kurz bzw. SAO01.lang folgen dem Startcodon die Aminosäuren Lysin, Leucin und Phenylalanin. Eine weitere Ursache für eine geringe Proteinausbeute kann die Toxizität des exprimierten Proteins sein (Naumann, 2003).

Da mit dem Weglassen des Signalpeptids auch das native Startcodon ATG entfiel, musste nun ein künstliches Startcodon eingefügt werden. *NdeI* enthält in seiner Erkennungssequenz bereits ein ATG. Da das Restriktionsenzym die Erkennungssequenz genau vor dem Startcodon schneidet, befindet sich vor der abzulesenden Sequenz das benötigte Startcodon.

Nach dem Verdau der Vektoren als auch der PCR-Amplifikate mussten diese nach 2.4.4.2 aufgereinigt werden. Ein Restriktionsansatz wurde, wie unter 2.4.12.3 beschrieben, angesetzt, die Inkubation dauerte mindestens 16 h bei 37°C. Anschließend wurden der verdaute Vektor und die verdaute DNA nach 2.4.4.1 für die Ligation aufgereinigt, der Ligationsansatz wurde, wie unter 2.4.10.2 beschrieben, durchgeführt. Ligationen von *SalI*-Schnittstellen waren nur bei Inkubationen bei 22°C über einen Zeitraum von mindestens 16 h erfolgreich. Der Ligationsansatz wurde, wie unter 2.4.11 beschrieben, in TOP10-Zellen transformiert. Nach der Plasmidisolierung (siehe 2.4.5.1) wurden die positiven Klone durch eine Restriktionsanalyse (siehe 2.4.12.3) identifiziert und diese sofort zur Untersuchung der Expression in BL21 transformiert und induziert. Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall wurde der

Proteinextrakt auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Expression der rekombinanten Proteine zu überprüfen (siehe 2.4.13). Die Klone, deren cDNA erfolgreich exprimiert werden konnte, wurden mit Hilfe der Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe 2.5.9).

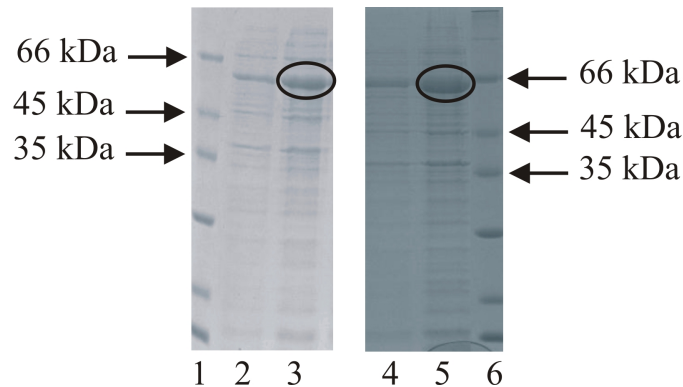


Abbildung 3.6: SDS-PAGE der Expression von SAO01.kurz und SAO01.lang . 1 10 kDa Proteinleiter. SAO01.kurz: 2 nicht induziert, 3 induziert. SAO01.lang: 4 nicht induziert, 5 induziert, 6 10 kDa Proteinleiter. Bei den eingekreisten Banden handelt es sich um die Überexpressionsbanden.

Mit Hilfe der Software gcg (siehe 2.4.14) wurde für SAO01.kurz ein Molekulargewicht von 59 kDa und für SAO01.lang ein Molekulargewicht von 69 kDa vorhergesagt (siehe 3.2.3, 3.2.5.1). Anhand des SDS-Gels (siehe Abbildung 3.6) ist zu erkennen, dass die Expressionsbande von SAO01.lang deutlich größer ist als die von SAO01.kurz. Brückmann (Brückmann, 2002) hat in seiner Arbeit das Molekulargewicht der SAO auf 80 kDa bestimmt. Der Größenunterschied zwischen den rekombinanten Sequenzen SAO01.kurz und SAO01.lang und dem nativen Protein aus dem Wehrsekret kann dadurch zustande kommen, dass das native Protein aus dem Insekt modifiziert ist. Die MS/MS-Sequenzierung des Wehrsekrets von *C. populi* (siehe 3.1.1) hat gezeigt, dass die SAO glykosiliert ist. Wie groß der Zucker oder an welchen Aminosäuren dieser gebunden ist und wieviele Glykosilierungen vorkommen kann durch eine MS/MS-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Die Größe des N-glykosidisch gebundenen Zuckeranteils am Gesamtmolekulargewicht kann aber durch einen Verdau des nativen Enzyms mit PNGaseF (siehe 2.5.12) ermittelt werden. Durch PNGaseF werden alle N-glykosidisch gebundene Zucker eines Proteingerüsts abgespalten. Auf einem SDS-Gel ist es möglich, den Größenunterschied zwischen dem verdauten Protein, das nun keine N-glykosidisch gebundene Zucker mehr enthält, und dem nativen Protein zu erkennen. Die Deglykosilierung des Wehrsekrets von *C. tremulae* ergab auf einem SDS-Gel folgendes Bild:

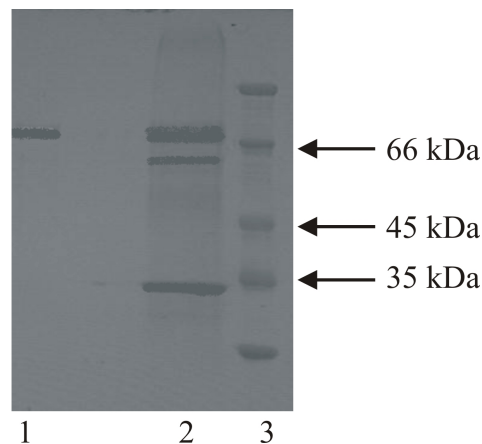


Abbildung 3.7: SDS-PAGE des unverdauten und des verdauten Wehrsekrets von *C. tremulae* mit PNGase F. 1 unverdaute Probe. 2 verdaute Probe. 3 10 kDa Proteinleiter (Fermentas)

Die unverdaute Probe zeigt in Abbildung 3.7 das native Protein mit einer Größe von etwa 80 kDa. Diese Größe ist nach Brückmann (Brückmann, 2002) zu erwarten. Die verdaute Probe weist zusätzlich zu dieser Bande eine weitere, kleinere Bande auf, die eine Größe von etwa 60 kDa hat. Die Probe scheint nicht vollständig verdaut zu sein. Im unteren Teil des Gels ist eine weitere Bande mit einer Größe von 35 kDa zu sehen. Dabei handelt es sich um die PNGase F.

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die native SAO glykosiliert ist und einen Größenunterschied von ca. 20 kDa zum behandelten Protein aufweist. Das rekombinante Protein von SAO01.kurz hat ein Molekulargewicht von 59 kDa (siehe 3.2.3) und hat damit etwa die gleiche Größe wie das mit PNGaseF behandelte Protein aus dem Wehrsekret. Um zu beweisen, dass die cDNA von SAO01.kurz mit der gesuchten SAO identisch ist, ist es nötig, ein Enzymassay des exprimierten Proteins durchzuführen. Die Durchführung und das Ergebnis des Enzymassays werden in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben.

3.2.5.3 Enzymassay

Für das Enzymassay war zur Überprüfung der SAO-Aktivität der rekombinanten Proteine SAO01.kurz bzw. SAO01.lang das gereinigte Protein nötig. Eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine war jedoch über die Ni-NTA-Agarose (siehe 2.5.9) nicht möglich. Auf einem SDS-Gel war zwar eine deutliche Expression zu erkennen und das Protein war jeweils löslich, aber die Elutionsfraktion wies kein Protein auf. Möglicherweise konnte der HisTag nicht an der Säule binden, obwohl durch eine Kontrollsequenzierung der Zielsequenzen in pET-22b(+) bestätigt wurde, dass sechs Histidin-Reste am C-terminalen Ende vorhanden waren.

Zur erfolgreichen Reinigung der rekombinanten Proteine sind mehrere Alternativen möglich:

1. Klonierung von SAO01.kurz und SAO01.lang in pET22b(+) mit Einfügen der sechs Histidin-Reste am N-terminalen Ende. Der bisher vorhandene Histidin-Rest am C-

terminalen Ende verhindert möglicherweise aus sterischen Gründen eine erfolgreiche Bindung an die Säule.

2. Klonierung in einen anderen Vektor.
3. Verwendung einer anderen Säule wie z. B. Co-Agarose.

Da somit eine Reinigung der rekombinanten Proteine unter diesen Bedingungen nicht möglich war, wurde das Enzymassay mit dem Rohextrakt durchgeführt. Die genaue Durchführung des Enzymassays wurde unter 2.5.10 beschrieben. Der Versuch wurde sowohl mit der langen als auch mit der kurzen Sequenz der hypothetischen SAO durchgeführt, um beide codierte Proteine auf eine mögliche SAO-Aktivität zu untersuchen.

Die Enzymaktivität der SAO wurde über die Quantifizierung des Reaktionsproduktes Salicylaldehyd mit Hilfe einer gaschromatographischen Analyse bestimmt. Die Chromatogramme der GC-Messung wiesen auf keine Aktivität hin. In beiden Ansätzen war jeweils nur der Peak erkennbar, der dem Substrat Salicylalkohol zugeordnet werden konnte.

Die rekombinanten Proteine von SAO01.kurz und SAO01.lang zeigten keine SAO-Aktivität. Dieses Ergebnis führte zu folgenden Vermutungen, die die in Kapitel 3.2.4 aufgestellten Hypothesen bestätigen oder entkräften:

1. SAO01.kurz ist ein Pseudogen und zeigte daher keine SAO-Aktivität. Dies deckt sich mit der ersten Hypothese, die in Kapitel 3.2.4 aufgestellt wurde.
2. Der frühe Stopp ist nicht auf einen Lesefehler der *Taq*-DNA-Polymerase oder einen Sequenzierfehler zurückzuführen. Würde es sich um einen solchen Fehler handeln, müsste SAO01.lang SAO-Aktivität zeigen. Die zweite Hypothese aus Kapitel 3.2.4 trifft somit nicht zu.
3. In der dritten Hypothese wurde vermutet, dass SAO01.kurz tatsächlich so kurz ist und der hintere Teil der Sequenz für die Aktivität der SAO nicht nötig ist (siehe 3.2.4). Demnach müsste SAO01.kurz im Enzymassay Aktivität zeigen. Der negative Aktivitätstest zeigt, dass diese Hypothese nicht zutrifft.

Die negativen Aktivitätstests könnten auch darauf zurückzuführen sein, dass die heterologe Expression aus anderen, nicht bekannten Gründen kein aktives Protein bilden kann und somit im Enzymassay keine Aktivität des entsprechenden Proteins zu erkennen ist.

Da die erhaltenen Sequenzen SAO01.kurz und SAO01.lang keine SAO-Aktivität zeigten und die bisherigen PCR-Versuche keine weiteren SAO-Sequenzen ergaben, wurde zunächst auf eine andere Art ausgewichen. *C. populi* ist mit *C. tremulae* nah verwandt. Desweiteren zeigte ein Peptid aus der 2D-Elektrophorese des Wehrsekrets von *C. populi* eine hohe Homologie zu GMC-Sequenzen aus Insekten (siehe 3.1.1). Aus den genannten Gründen wird versucht aus dieser nah verwandten Art von *C. tremulae* eine SAO codierende cDNA zu klonieren, um diese mit den vorliegenden Sequenzen SAO01.kurz bzw. SAO01.lang vergleichen zu können.

Die Durchführung und die Ergebnisse dieses Versuches werden in Kapitel 3.2.5.4 dargestellt. Parallel wurde versucht, mit neuen Primerkombinationen und anderen PCR-Bedingungen weitere SAO-codierende cDNA-Sequenzen aus *C. tremulae* zu identifizieren (siehe 3.2.5.5).

3.2.5.4 Identifizierung der SAO aus *C. populi*

Das Enzymassay zur Kontrolle der SAO-Aktivität von SAO01.kurz und SAO01.lang aus *C. tremulae* war nicht erfolgreich (siehe 3.2.5.3). Somit konnte kein Beweis geliefert werden, dass die kurze oder lange Sequenz eine SAO codierende cDNA ist. Mit Hilfe degenerierter Primer sollte eine SAO codierende cDNA aus *C. populi* amplifiziert werden.

Die Gesamt-RNA wurde wie bei *C. tremulae* isoliert (siehe 3.2.2) und mit Superscript[®] III (Invitrogen) bei 55°C mit dem Oligo(dT)-Primer revers transkribiert (siehe 2.4.7). In einer PCR wurden als Primer P13 (Forward, siehe 3.3) und Oligo(dT) (Reverse) verwendet (siehe B). Als Taq-Polymerase wurde die AccuTaq von Sigma eingesetzt. Bei einer Annealing-Temperatur von 45°C wurde mit einem Standard-PCR-Temperaturprogramm eine Bande mit etwa 1600 Basenpaaren amplifiziert, die anschließend in den TOPO[®]-XL-Vektor (Invitrogen) kloniert wurde (siehe 2.4.10.1). Das resultierende Konstrukt wurde in TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.4.11). Um zu überprüfen, ob die Fremd-DNA erfolgreich in den Vektor kloniert wurde, wurde eine Plasmidisolierung (siehe 2.4.5.2) mit anschließendem Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt. Einer der erfolgreich transformierten Plasmide wurde sequenziert (siehe 2.4.14).

Die Sequenzierung ergab eine Sequenz, die im Bereich des 5'-Endes auf ca. 600 bp nicht zu lesen war. Am 3'-Ende war der Oligo(dT)-Primer deutlich zu erkennen und die Sequenz auf einer Länge von 817 Basen (ohne Poly-A-Schwanz) gut zu lesen. Bis zum ersten Stoppcodon hatte die Sequenz aus *C. populi*, die im Folgenden SAO03 genannt wird, 211 Aminosäuren. Die Sequenzanalyse von SAO03 auf Aminosäureebene mit Datenbanken ergab eine Homologie von etwa 60% mit den GMCs (siehe 2.4.15). Der Sequenzvergleich zwischen SAO03 und SAO01.lang aus *C. tremulae* zeigte eine 89%ige Identität der beiden Sequenzen auf ganzer Länge. Die Sequenzen SAO01.kurz, SAO01.lang und SAO03 wurden in einem Alignment so dargestellt, dass Bereiche, die eine Homologie zeigen, untereinander zu liegen kamen und graphisch hervorgehoben werden konnten. Bei der 519. Aminosäure von SAO01.lang, die sich im Bereich des Stoppcodons von SAO01.kurz befindet, sind im Vergleich mit SAO03 fünf Aminosäuren komplett unterschiedlich.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den in Kapitel 3.2.4 aufgestellten Hypothesen kann folgendes festgestellt werden: SAO03 aus *C. populi* weist im Bereich des Stoppcodons von SAO01.kurz kein Stoppcodon auf und zeigt am 3'-Ende zu verschiedenen GMC-Sequenzen (z. B. CG9522) Homologie. Es wird vermutet, dass die vollständige Sequenz der SAO03 ähnlich lang ist wie die GMC-Sequenzen (siehe 3.2.4). Dies deutet darauf hin, dass SAO01.kurz tatsächlich ein Pseudogen ist.

Mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.5.3 und Kapitel 3.2.5.4 kann die erste Hypothese aus Kapitel 3.2.4 bestätigt werden: bei SAO01.kurz handelt es sich um ein Pseudogen, dessen

fehlende SAO-Aktivität auf fehlende Aminosäuren infolge eines verfrühten Stoppcodons im ORF zurückzuführen ist. Ein Lesefehler der *Taq*-DNA-Polymerase oder ein Sequenzierfehler sind ausgeschlossen.

3.2.5.5 Identifizierung einer weiteren SAO aus *C. tremulae*

Parallel zu den Versuchen mit den Larven aus *C. populi* (siehe 3.2.5.4) wurden PCR-Versuche mit verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt, um Sequenzen aus *C. tremulae* zu klonieren, die den GMC-Sequenzen und der SAO03 aus *C. populi* homolog sind. Im folgenden Abschnitt werden nur die erfolgreiche Primerkombination und die dazugehörigen Versuchsbedingungen beschrieben.

Das Template für die PCR wurde wie in 3.2.5.4 beschrieben erhalten. In einer Standard-PCR wurden die Expressionsprimer P09 und P10 verwendet, die zur Proteinexpression bereits eingesetzt wurden (siehe 3.2.5.2). Eine Bande mit etwa 1600 Basenpaaren wurde amplifiziert, die anschließend wie unter 3.2.5.4 beschrieben bis zur Sequenzierung einer positiven Plasmid-DNA behandelt wurde.

Tabelle 3.2: PCR-Bedingungen zum Erhalt von SAO01.neu aus *C. tremulae*

Bedingungen	Mittelstück
PCR-Programm	Standard-PCR touch down
<i>Taq</i> -Polymerase	AccuTaq (Sigma)
Annealing-Temperatur	60°C auf 45°C
Primer	P09 + P10
Bandengröße	1600 bp
Klonierung	TOPO®-XL

Eine Sequenzanalyse dieser Sequenz, die im Folgenden SAO01.neu genannt wird, mit verschiedenen Datenbanken zeigte auf Aminosäureebene Homologie zu den bereits bekannten GMCs. Zudem ist SAO01.neu mit 605 Aminosäuren bis zum ersten Stoppcodon ähnlich lang wie die GMCs (siehe 3.2.4). Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene mit CG9522 lag bei 57%.

Der Vergleich der Sequenzen SAO01.neu und SAO01.lang wies eine Identität von 99% auf (Aminosäureebene). Dabei unterschieden sich die Sequenzen in zehn Aminosäuren bzw. 29 Basen. Dazu gehört ein Bereich, der in SAO01.kurz sechs Aminosäuren vor dem Stoppcodon liegt und den fünf Aminosäuren entspricht, die zum ersten Mal in SAO03 auftauchten (siehe 3.2.5.4). SAO01.neu und SAO03 (die vermutete SAO-codierende cDNA aus *C. populi*) zeigten auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 92%.

Mit diesem Ergebnis ist ein weiterer Hinweis dafür gegeben, dass es sich bei SAO01.kurz

um ein Pseudogen handelt. Die ersten Hinweise wurden bereits in Kapitel 3.2.5.4 aufgeführt.

Um zu beweisen, dass SAO01.neu die SAO codierende cDNA ist, muss sie zum Beweis der SAO-Aktivität zur Expression gebracht werden (siehe 3.2.5.2 und 3.2.5.3). Da die cDNA-Sequenz von SAO01.neu mit Hilfe der Expressionsprimer P09 und P10 erhalten wurde, kann diese direkt in den pET22b(+)-Vektor kloniert werden (siehe 3.2.5.2).

3.3 Identifizierung einer weiteren GMC-homologen cDNA aus *C. tremulae*

Die SAO, die die Reaktion vom Salicylalkohol zum Salicylaldehyd katalysiert, hat sich wie unter 1.1.2 beschrieben wahrscheinlich nach dem Wirtswechsel der Käfer der Gattung *Chrysomela* auf Salicaceen aus anderen Oxidasen entwickelt. Vorläufer der SAO können Oxidasen aus dem Grundstoffwechsel sein. Diese müssen nicht Bestandteil des Wehrsekrets sein. Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich noch weitere den GMCs homologen Sequenzen in den Larven von *C. tremulae* befinden.

Es wurde ein Aminosäure-Alignment verschiedener GMCs aus *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* und *Candida* erstellt (siehe Abbildung 3.8) und degenerierte Primer auf die hoch konservierten Bereiche der Sequenzen entworfen. Einige der Aminosäuren in den hoch konservierten Bereiche waren nicht identisch, so dass nicht alle Aminosäuren beim Entwurf der degenerierten Primer berücksichtigt wurden.

1. Peptid: Y D F I/V I/V I/V G P12 (Forward)
2. Peptid: N Y M M/I/L Y N/T/V R G P13 (Forward)
3. Peptid: Q L/I L M L S G P14 (Reverse)

		*	20	*	40	*	60	*	80	
Anopheles	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	: 29
Apis	:	~~~	~~~	~~~	~~~	~~~	~~~	~~~	~~~	: 78
Candida	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	: 29
CG9522	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	: 72
Drosophila	:	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	: -
										P12:-----
		*	100	*	120	*	140	*	160	
Anopheles	:	RDWNVLLIEAGEQ--	ENLFVQVHIF	SAYLQSTSYN	WG--	YLAEPQNYSC	WGMKDQPC	SVPRGKGL	GGSTILIN	MYVVRGNK : 106
Apis	:	PKWNVLLIEAGPD--	ENEVTDVHSL	AAYLQTKIDW	K--	YKTEPTGRAC	LAMKDGRCN	WPRGKVL	GGSSVLN	MYLVVRGNR : 155
Candida	:	ENLKVLLIENCEN	NLNNPWVY	LGIIYPRN	RLDSKTAT	FYNSRESKH---	LNGRAIVP	QANILGG	SSINFM	MYTRASA : 106
CG9522	:	PNWSVFLIEAGV--	ENIVHQVLL	AAHLQSTAS	NWG--	YNSTPORHAC	RGMPDNKAL	PRGKVL	GGTSSIN	MYIYNRGNR : 149
Drosophila	:	~~~~~	gd--epvgac	igsmflnfig	sddidyr--	ynteperma	clssaedc	cywprgk	vlvgtsvm	ngmmymrgnr : 66
										P13:-----
		*	180	*	200	*	220	*	240	
Anopheles	:	YDYDQWSAAGN	DGWSFDELL	PYHVKSEK	SYLR--	EVNRYHGM	DGNLDVRY	LPVTRIAK	LEVNAWR	ELGLESVDYNGESOI : 185
Apis	:	HDYDHWESMGN	FGWGDQAL	YVHKKSE	DNRNYPY	LQKSPYH	STGGYLT	VQESP	KTPVVA	FVQAGTIGIYENRDLNGEROT : 236
Candida	:	SDYDDWES---	EGWITDELL	PLMKKEE	TYQRCNN	RVDVHGF	DGPIKVS	FGNITY	PQCQD	FLRACETQGIPIYVDLEDLKT : 183
CG9522	:	RDFDAWAAAGN	FGWSYDEV	LPYHLRSE	HAQLQGLE	HSPYHNH	SGPLSV	EDVRH	RTRIAH	AMIRAAQIACHPRTDYNGESOL : 230
Drosophila	:	edydnwaacgn	gwayndvlp	pfkkse	dnqeldev	gteyhakgg	llpvgkfp	ynppls	yailkage	lglfsvqgllngqnst : 147

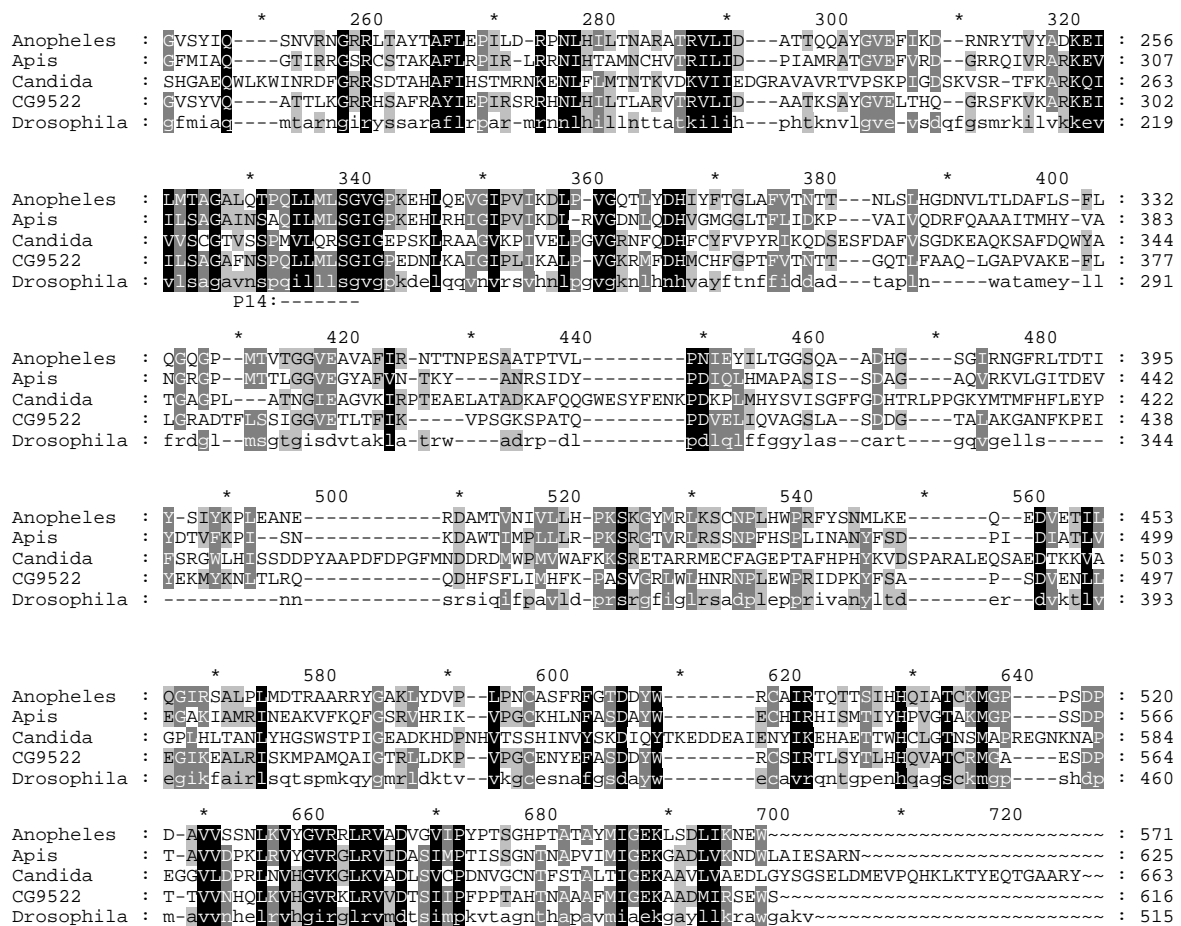


Abbildung 3.8: Verschiedene GMCs: *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Candida elegans* und zwei aus *Drosophila melanogaster* (CG9522 und Drosophila). -----: Positionen von P12, P13 und P14.

3.3.1 Von der RNA zur ganzen Sequenz

Die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription wurden wie unter 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Die PCR war mit der AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma in einem engen Annealing-Temperaturbereich von $60,3 \pm 3^\circ\text{C}$ erfolgreich. Das erhaltene Amplifikat hatte eine Länge von etwa 1600 Basenpaaren. Als Primer wurden P13 und Oligo(dT) eingesetzt (siehe Anhang B).

Das Amplifikat wurde in den TOPO[®]-XL-Vektor kloniert und das resultierende Konstrukt in TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.4.10.1 und 2.4.11). Zur Überprüfung der Transformation wurde eine Plasmidisolierung und ein anschließender Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt (siehe 2.4.5.2, 2.4.12). Eines der Plasmide, bei denen die Transformation erfolgreich war, wurde sequenziert (siehe 2.4.14).

Die Sequenzierung ergab eine cDNA-Sequenz, die am 5'-Ende den Primer P13 und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz enthielt und somit 1564 Basen lang war. Die Aminosäuresequenz zeigte bei einer Sequenzanalyse mit Datenbanken eine Homologie von etwa 70% zu den bereits bekannten GMCs. Mit SAO01.lan zeigte die gefundene Sequenz eine Identität von 58%. Daher wurden genspezifische Primer (siehe 2.4.1) entworfen, um mit Hilfe der 5'-RACE (siehe 2.4.8.4) die vollständige Sequenz zu erhalten. Da durch Verwendung des Oligo(dT)-Primers bereits das 3'-Ende der gesuchten cDNA erhalten wurde, ist das 3'-Ende bekannt und eine 3'-RACE nicht nötig.

P15 diente als GSP1-Primer zur cDNA-Synthese. P16 wurde als Forward-Primer und AAP als Reverse-Primer und in einer nested PCR P17 und AAP verwendet (siehe Anhang B). Das 700 bp große Amplifikat wurde wie oben bereits beschrieben in den TOPO[®]-XL-Vektor kloniert, transformiert und ein Klon schließlich sequenziert.

Tabelle 3.3: PCR-Bedingungen zum Erhalt der Sequenz von SAO02

Bedingungen	Mittelstück + 3'-Ende	5'-Ende	
PCR-Programm	Standard-PCR konstant	Standard-PCR touch down	nested konstant
Taq-Polymerase	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)
Annealing-Temperatur	60, 3°C	70°C auf 55°C	65°C
Primer	P13 + Oligo(dT)	P16 + AAP	P17 + AAP
Bandengröße	1600 bp	Schmier bei 500 bp	700 bp
Klonierung	TOPO [®] -XL		TOPO [®] -XL

Die Sequenzanalyse des 5'-RACE-Fragmentes ergab im hinteren Bereich eine ca. 189 bp lange Sequenzidentität zum Mittelstück und 3'-Ende, so dass die Sequenzen zusammengefügt werden konnten. Die zusammengesetzte Sequenz wird im Folgenden SAO02 genannt.

Der Datenbankvergleich von SAO02 auf Aminosäureebene ergab eine Homologie von etwa 55% mit den GMCs (siehe 2.4.15). Die charakteristische FAD-Bindungsstelle als auch die hoch konservierten Bereiche der GMCs waren in SAO02 bis zum Stoppcodon zu erkennen. Vor der FAD-Bindungsstelle befand sich ein Methionin, welches als Startcodon interpretiert wurde, da dieses ATG in seiner Lage den Startcodons anderer GMCs in einem Alignment entsprach. SAO02 hatte somit vom Startcodon bis zum ersten Stoppcodon eine Länge von 193 Aminosäuren. Der nicht codierende Bereich am 5'-Ende hatte eine Länge von 23 Basen. Nach dem Stoppcodon war auf Aminosäureebene keine Homologie zu den GMCs zu erkennen. Wurde die Sequenz jedoch in dem Leserahmen weitergelesen, in den man durch Hinzufügen von zwei Basen vor dem Stoppcodon gelangte, so entfiel das Stoppcodon. Dahinter war eine Identität der Sequenz von 47% bis zum Stopp der *Drosophila*-Sequenzen feststellbar.

SAO02 zeigte mit SAO01.kurz trotz des frühen Stopps eine Sequenzidentität von 55%. Das Stoppcodon in SAO02 lag deutlich vor dem der SAO01.kurz-Sequenz (bei der 525. Aminosäure).

Durch eine Sequenzanalyse mit SignalP3.0 und PSORT (siehe 2.4.15) konnte ein Signalpeptid nicht erkannt werden. Von PSORT wurde die Aminosäuresequenz als cytosolisch eingestuft und war somit nicht extrazellulär. SAO02 ist somit mit einer Länge von 193 Aminosäuren im Vergleich mit bekannten GMCs sehr viel kürzer. GMCs haben eine Länge von etwa 600 Aminosäuren (siehe 3.2.4).

Der im Vergleich mit anderen GMCs viel zu frühe Stopp in SAO02 und die Homologie nach dem Stopp in einem anderen Leserahmen war bereits bei SAO01.kurz zu beobachten (siehe 3.2.4). Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass es sich bei SAO02 wie bei SAO01.kurz um ein Pseudogen aus der Familie der GMCs handelt.

3.4 Mutmaßliche Katalase aus *C. tremulae*

Bei der Bildung der Wehrsubstanz Salicylaldehyd entsteht Wasserstoffperoxid, das als Zellgift wirkt. Eine Katalase im Wehrsekretreservoir erfüllt die Aufgabe der Entgiftung. Eine Katalase-Aktivität wurde von Brückmann (Brückmann, 2002) im Wehrsekret nachgewiesen. Die Katalase katalysiert die Umsetzung von entstandenem Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff (siehe 1.1.2.2). Diese Reaktion ist in vielen Organismen verbreitet. Daher wird angenommen, dass die gesuchte Sequenz der Katalase denen bekannter Katalasen aus anderen Organismen sehr ähnlich ist. Diese Hypothese wird durch MS/MS-Peptide und durch die erhaltene Sequenz bestätigt (siehe 3.4.1 und 3.4.2).

Die Katalase wurde, wie die SAO, aus dem Wehrsekret isoliert. Mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließender MS/MS-Sequenzierung wurden Peptidsequenzen identifiziert, die zu Katalasen verschiedener Organismen homolog waren (siehe 3.4.1). Bei den gefundenen Peptidsequenzen sollte es sich daher um eine Katalase aus dem Wehrsekretreservoir handeln, die an der Bildung der Wehrsubstanz Salicylaldehyd beteiligt ist.

3.4.1 Bau degenerierter Primer mit Peptiden aus der MS/MS-Sequenzierung aus dem Wehrsekret von *C. tremulae*

Auf einer SDS-PAGE des Wehrsekrets von *C. tremulae* war nach der Coomassie-Färbung unter der SAO-Bande eine deutlich dünnere Bande erkennbar wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist (siehe 3.2.1). Diese Bande wurde ebenfalls ausgeschnitten, gewaschen und getrocknet und zur MS/MS-Sequenzierung ins HZI geschickt.

Neun Peptide wurden sicher sequenziert, wovon sechs eine deutliche Homologie zu Katalasen verschiedener Organismen wie *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* und *Apis mellifera* aufzeigen. Auf Grundlage dieser Peptide wurden folgende degenerierte Pri-

mer entworfen: P03 und P04 als Forward- und Reverse-Primer aus dem dritten Peptid, das achte Peptid diente als Vorlage für P05 (siehe Anhang B).

1. Peptid:	DLYNALEEGK	homolog zu einer Katalase
2. Peptid:	LVDNLAGSLCK	keine Homologie
3. Peptid:	LGTNYEQLPVN	homolog zu einer Katalase
4. Peptid:	QSFNPFDLTK	homolog zu einer Katalase
5. Peptid:	LLAGQDPDYAVR	homolog zu einer Katalase
6. Peptid:	LGNLTDDNTLLVYK	keine Homologie
7. Peptid:	DLFSQVDQNLGDR	keine Homologie
8. Peptid:	DPQQAELLAGQDPDYAVR	homolog zu einer Katalase
9. Peptid:	YPSWTFYQLQTMTEQAK	homolog zu einer Katalase

Bei den Peptiden, die keine Homologie mit Katalasen aufzeigen, kann es sich um Bereiche der Sequenz handeln, die im nicht konservierten Bereichen der Katalasen liegen. Die unbekannten Peptide sollten später mit der kompletten Sequenz der Katalase verglichen werden, um zu prüfen, ob sie tatsächlich Teil der Katalasen-Sequenz sind oder ob es sich um Peptide weiterer Proteine des Wehrsekrets handelt (siehe 3.4.3).

3.4.2 Von der RNA zur ganzen Sequenz

Die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription wurden wie bei der Identifizierung von SAO01.kurz durchgeführt (siehe 3.2.2).

Mit Hilfe der degenerierten Primer P03 (Forward) und Oligo(dT) (Reverse) (siehe 3.4.1) wurde ein Mittelstück inklusive 3'-Ende der cDNA-Sequenz einer Katalase aus dem Wehrsekret ermittelt. Dieser Teil der cDNA war ohne den Poly-A-Schwanz 497 Basen lang. Da ein Datenbankvergleich auf Aminosäureebene bereits eine Homologie zu Katalasen verschiedener Organismen ergab, wurde mit Hilfe der 5'-RACE versucht, die vollständige Sequenz der Katalase zu erhalten (siehe 2.4.8.4). PCR-Versuche schlugen fehl: es wurde kein Amplifikat erhalten. Grund dafür scheint eine unvollständige reverse Transkription der RNA zu sein, so dass das 5'-Ende nicht umgeschrieben wurde.

Daher wurde zunächst ein interner spezifischer Primer P18 (siehe Anhang B) entworfen. Mit Hilfe dieses spezifischen Primers im bekannten Teil und einem degenerierten Primer im noch unbekannten Teil sollte ein weiteres Stück der cDNA amplifiziert werden. Eine PCR mit dem internen spezifischen Primer P18 (Reverse) und dem degenerierten Primer P05 (Forward) (siehe 3.4.1) ergaben ein Amplifikat von der Größe von etwa 800 bp, die in TOPO®-XL kloniert und dann in TOP10-Zellen transformiert wurde. Nach der Transformation wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt (siehe 2.4.5.1). Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wurden die Plasmide mit *EcoRI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.4.12). Einer der Plasmide, bei denen die Transformation erfolgreich war, wurde sequenziert (siehe 2.4.14).

Tabelle 3.4: PCR-Bedingungen zum Erhalt der Sequenz der Katalase

Bedingungen	Mittelstück + 3'-Ende	weiteres Mittelstück
PCR-Programm	Standard-PCR touch down	Standard-PCR konstant
Taq-Polymerase	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)
Annealing-Temperatur	60°C auf 45°C	60, 8°C
Primer	P03 + Oligo(dT)	P05 + P18
Bandengröße	500 bp	700 bp
Klonierung	TOPO [®] -XL	TOPO [®] -XL

Die Sequenzierung des Klons ergab ein Amplifikat mit der Größe von 722 Basen. Die Sequenzanalyse dieses Fragmentes ergab im hinteren Bereich eine 379 bp lange Sequenzidentität zum Mittelstück und 3'-Ende, so dass die Sequenzen zusammengefügt werden konnten. Insgesamt ist die bekannte cDNA-Teilsequenz im codierenden Bereich der gesuchten Katalase ohne Poly-A-Schwanz 831 Basen lang.

Weitere Versuche das 5'-Ende zu finden schlugen aus unbekanntem Grund fehl. Da zur gegebenen Jahreszeit zusätzlich keine frischen Larven zur RNA-Isolierung zur Verfügung standen, wurde auf genomischer Ebene weitergearbeitet. Dazu wurde die genomische DNA aus Larven isoliert, die bei -80°C eingefroren waren. Die Möglichkeit auf genomischer Ebene zu arbeiten, war nur deshalb gegeben, da es bereits bekannte Sequenzen verschiedener Katalasen gibt, die homolog sind. Zudem gibt es verschiedene Programme, die ORFs vorhersagen können. Introns und Exons aus der genomischen Sequenz können so erkannt werden.

Auf genomischer Ebene wurde eine Adapter Ligation-PCR und eine Inverse PCR durchgeführt (siehe 2.4.8.2, 2.4.8.3). Dazu wurde wie unter 2.4.3 beschrieben genomische DNA aus den eingefrorenen Larven isoliert. Im Laufe verschiedener Ansätze wurde deutlich, dass sich immer nur ein Primer spezifisch anlagert, während der andere Primer sich unspezifisch oder gar nicht anlagerte. Aus diesem Grund war es nicht möglich, weitere Teilsequenzen der gesuchten Katalase zu amplifizieren.

3.4.3 Vergleich mit Datenbanken

Der Vergleich der bereits erhaltenen Teilsequenz einer cDNA aus *C. tremulae*, die vermutlich eine Katalase codiert, mit Datenbanken (siehe 2.4.15) zeigte Homologie gegenüber Katalase-Sequenzen verschiedenster Insekten. Beispiele hierfür sind Katalasen aus *Apis mellifera*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* und *Caenorhabditis elegans*. Die Peptide, die durch die MS/MS-Sequenzierung des Wehrsekrets erhalten wurden (siehe 3.4.1), sind bis auf das sechste Peptid alle in der Teilsequenz zu finden. Das zweite und das siebte Peptid, die beide keine Homologie zu Katalasen zeigten, befinden sich im Bereich der letzten 60 Aminosäuren vor dem Stoppcodon. Dieser Bereich ist innerhalb der Katalasen nicht mehr hoch konserviert. Die Peptide wurden daher in den Datenbanken nicht als Teil-

le einer Katalasesequenz identifiziert. Das sechste Peptid, welches nicht in der Teilsequenz von *C. tremulae* gefunden wurde, könnte im noch fehlenden Teil der Sequenz liegen. Eine weitere Vermutung ist die Zugehörigkeit des Peptids zu einem weiteren Protein des Wehrsekrets. Diese Vermutungen können erst überprüft werden, wenn die vollständige Sequenz der mutmaßlichen Katalase aus *C. tremulae* vorliegt.

3.5 Mutmaßliche β -Glucosidase aus *C. tremulae*

Salicin wird von der Larve der Wirtspflanze aufgenommen, aus dem Darm resorbiert und über die Hämolymphe direkt zum Wehrsekretreservoir transportiert. Eine β -Glucosidase, die aus den Drüsenzellen stammt, spaltet die Glucose des Salicins ab und bildet Saligenin, welches weiter zu Salicylaldehyd oxidiert wird. Die Glucose kann von der Larve zur Energiegewinnung resorbiert werden (siehe 1.1.2). Die Reaktionen laufen im exokrinen Reservoir der Larve ab (siehe 3.1). Auch die β -Glucosidase müsste sich demnach im Wehrsekret befinden und wie die Katalase und die SAO auf einem SDS-Gel nachweisbar sein. Die bereits untersuchten Banden gaben leider keinen Hinweis auf eine β -Glucosidase, so dass zunächst der Nachweis einer Aktivität im Wehrsekret erbracht wurde, um anschließend mit degenerierten Primern aus einem Alignment verschiedener β -Glucosidasen die cDNA zu identifizieren.

3.5.1 Nachweis einer β -Glucosidase-Aktivität aus dem Wehrsekret

In der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) wurde eine geringe Aktivität einer β -Glucosidase in frischem Wehrsekret von *C. populi* nachgewiesen. In dieser Arbeit sollte ein weiterer Test die Glucosidase-Aktivität im Wehrsekret von *C. tremulae* belegen. Dieser Test wurde wie in 2.5.11 beschrieben durchgeführt. Es wurde etwa 30 μ l frisches Wehrsekret auf eine native PAGE aufgetragen. Der anschließende Aktivitätstest konnte direkt im nativen Gel durchgeführt werden. Nach dem Aktivitätstest war eine leichte Violett-Färbung im oberen Teil des Gels zu erkennen. Dies lässt auf eine β -Glucosidase-Aktivität im Wehrsekret von *C. tremulae* schließen.

Da bisher auf einer SDS-PAGE keine Bande der β -Glucosidase zugeordnet werden konnte, wurde versucht, das im Aktivitätstest gefärbte Protein zu isolieren, um eine MS/MS-Sequenzierung möglich zu machen. Dazu wurde der Aktivitätsversuch mehrfach wiederholt, um genug Protein zu erhalten. Die violett gefärbten Banden wurden ausgeschnitten und mehrere Tage in Standardpuffer (siehe 2.5.2) gelagert, damit das Protein vollständig in den Puffer diffundieren konnte. Anschließend wurde die Probe mit TCA gefällt (siehe 2.5.3), auf eine SDS-PAGE aufgetragen (siehe 2.5.4) und mit Coomassie (siehe 2.5.7) gefärbt. Auf dem Gel war keine Bande zu erkennen, so dass eine MS/MS-Sequenzierung der Proteinbande und somit eine Identifizierung der β -Glucosidase aus dem Wehrsekret auf diesem Weg nicht möglich war.

3.5.2 Identifizierung einer β -Glucosidase aus dem Wehrsekret von *C. tremulae* mit Hilfe einer nativen PAGE

Da der Aktivitätstest (siehe 3.5.1) auf das Vorhandensein einer β -Glucosidase im Wehrsekret schließen lässt, wurde im Folgenden versucht, die β -Glucosidase direkt aus einer nativen PAGE zu isolieren. Möglicherweise befindet sich die β -Glucosidase unter der Bande der SAO oder der Katalase, so dass sie nicht eindeutig identifiziert werden kann oder sie ist im Vergleich zu den anderen beiden Enzymen in so geringer Konzentration in der Wehrdrüse enthalten, dass sie unter der Nachweisgrenze des Coomassie-Farbstoffs liegt.

Die native PAGE wurde wie in 2.5.5 beschrieben durchgeführt. Als Probe diente in Ammoniumsulfat gefälltes Wehrsekret von *C. tremulae*. In diesem Versuch konnte gefälltes Wehrsekret verwendet werden, da die MS/MS-Sequenzierung keine aktiven Enzyme benötigt. Die Probe wurde wie in 2.5.2 und 2.5.3 beschrieben aufgearbeitet, auf das Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt.

Auf dem Gel (siehe 3.9) sind drei Banden zu sehen:

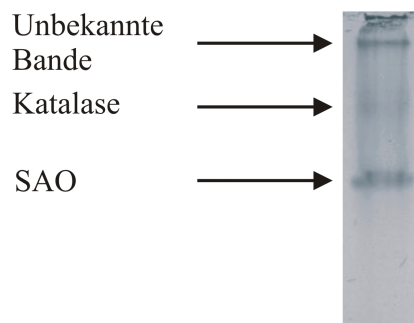


Abbildung 3.9: Native PAGE mit dem Wehrsekret von *C. tremulae*

Jede Bande wurde mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit autoklaviertem Wasser drei Mal gewaschen. Die Gelstücke wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und zur MS/MS-Sequenzierung ins HZI gegeben (siehe 2.5.14).

Zwei der drei Banden konnten eindeutig als Katalase und SAO identifiziert werden (siehe Abbildung 3.9). Die dritte oberste Bande konnte nicht zugeordnet werden. Aus dieser Bande wurden vier Peptide sequenziert:

1. Peptid LNTFFQQLR
2. Peptid LYDEFT
3. Peptid TNPLEGS
4. Peptid LAFAPLSGTWDGYFELLR

Auf zwei der Peptide wurden degenerierte Primer entworfen: P19 wurde basierend auf das

erste Peptid, P20 auf das vierte Peptid jeweils als Forward-Primer entworfen. Das zweite und das dritte Peptid zeigten beim Entwurf degenerierter Primer eine zu hohe Degeneriertheit, so dass diese Primer nicht eingesetzt wurden. Ein Datenbankvergleich der Peptide zeigte keine Homologie zu einer bereits bekannten Sequenz.

Zur Durchführung von PCR-Versuchen wurde die RNA aus den Larven von *C. tremulae* isoliert und die Reverse Transkription wie bei der Identifizierung von SAO01 kurz durchgeführt (siehe 3.2.2). PCR-Versuche mit dem Primer P19 (Forward) und Oligo(dT) (Reverse) führten zu einem etwa 800 bp großen Amplifikat. Als Temperaturprogramm wurde ein konstantes Standard-Programm gewählt, dessen Annealingtemperatur bei 55°C lag (siehe 2.4.8). Das Amplifikat wurde in TOPO®-TA kloniert und dann in TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.4.10.1, 2.4.11). Nach der Transformation wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt (siehe 2.4.5.2). Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wurden die Plasmide mit *EcoRI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.4.12). Einer der Plasmide, bei denen die Transformation erfolgreich war, wurde sequenziert (siehe 2.4.14).

Die Sequenzanalyse ergab eine cDNA, die ohne Poly-A-Schwanz eine Länge von 484 Basen hatte. Wurde die Basensequenz in die Aminosäuresequenz umgewandelt, erschien nach dem Forward-Primer, der dem ersten Peptid entsprach, ein Stoppcodon. Dies deutet darauf hin, dass sich die Primer unspezifisch angelagert haben. Weitere PCR-Versuche brachten keine weiteren Amplifikate.

3.5.3 Identifizierung einer cDNA mit Homologie zu β -Glucosidase-codierenden cDNAs

Da keine Peptidsequenzen der β -Glucosidase aus dem Wehrsekret vorliegen und die in 3.5.2 beschriebene PCR kein Ergebnis brachte, wurde ein Alignment verschiedener bekannter β -Glucosidase-Sequenzen aus Insekten erstellt (siehe Abbildung 3.10).

Das Problem der Identifizierung einer β -Glucosidase auf diesem Weg bestand darin, dass eine gefundene Sequenz nicht unbedingt der β -Glucosidase aus dem Wehrsekret entsprechen muss, da die cDNA vom gesamten mRNA-Pool der Larve abgelesen wurde. β -Glucosidasen sind aber auch an anderen Stoffwechselprozessen der Larve beteiligt. Um zu beweisen, dass die gefundene cDNA mit der gesuchten β -Glucosidase identisch ist, ist es nötig, ein Enzymassay des exprimierten Proteins durchzuführen.

Aus dem Alignment wird deutlich, dass es hoch konservierte Bereiche innerhalb der Sequenzen gibt, die sich zum Entwurf degenerierter Primer eignen. Insgesamt wurden drei Primer entworfen: P21 aus dem ersten Peptid als Forward-Primer, P22 aus dem zweiten Peptid als Forward- und P23 als Reverse-Primer (siehe Anhang B).

- | | | |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|
| 1. Peptid | Y/H Q I E G G/A W N/D | P21 (Forward) |
| 2. Peptid | Y/F H W D/E L P Q | P22 (Forward) / P23 (Reverse) |

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
AAF49418 : ~~~~~mmqiilplfvlrtascldgspvsq---trifpndflwgvsssyqieggnwadkgesiwdfllththpeklvd : 68
EAL30328 : ~~~~~mfkillpavvliascldgspvsn---nrrfpndflwgvsssyqieggnwadkgesiwdfllththpeklvd : 68
XP_557100 : ~~~~~spsfiplnsfslalltpaaegkfarrfpndflwgvsssyqieggnwadkgesiwdrmtthqheklvd : 70
XP_316460 : ~~~~~rffpdgiefvgvtsayqieggnwadkgesiwdrmtthqheklvd : 44
AAG26008 : ~~~~~argaillicast---itladvpyyfpdgfvfgaataayvgvgwdeagkgesiwdrmtthqheklvd : 66
BAB91145 : ~~~~~mwvhtffvilllvvsgarrdvassdtv-ytffpdefklgaatasyqieggnwadkgesiwdrmtthqheklvd : 73
AAL25999 : ~~~~~mdykfpkdmfmgststasqieggnwadkgesiwdrmtthqheklvd : 47
AAP13852 : ~~~~~mawltttsilavchtglaaaytkfpegftrgvatashqieggnwadkgesiwdrmtthqheklvd : 65
AAC06038 : ~~~~~mkllvylslvavacnasivrrqrrfpddflfgtatasyqieggnwadkgesiwdrmtthqheklvd : 67
AAL40863 : mfwlvvsqillyfprdahcladipseaildnnpilinnltfpdgfvfgaataayqieggnwadkgesiwdeflththpeklvd : 82

```

```

      *          100          *          120          *          140          *          160
AAF49418 : rsggdysasynhgwkrdvqmykelhvgtyrfslswrprimggymnhvstagikeyynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 150
EAL30328 : gsnaditadsynhgwkrdvqmykelhvgtyrfslswrprimggymnhvstagikeyynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 150
XP_557100 : gsggdysasynhgwkrdvqmyrelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 152
XP_316460 : gsgtdvacdsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 126
AAG26008 : nsggdacdsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 148
BAB91145 : gatgdadadsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 155
AAL25999 : gsggdacdsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 129
AAP13852 : gsgtdvacdsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 147
AAC06038 : lsggdacdsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 149
AAL40863 : hsggdacdsynhgwkrdvemvnelgvdvyrfsldwprimggylmsvskagityynlidellrnyitpmvtlyhwelpgkl : 164

```

```

      *          180          *          200          *          220          *          240
AAF49418 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 232
EAL30328 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 232
XP_557100 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 234
XP_316460 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 208
AAG26008 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 230
BAB91145 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 237
AAL25999 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 210
AAP13852 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 229
AAC06038 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 231
AAL40863 : qelggwtntpelipfkdylarlvemmygdvrkwtltneswhvcehgygdymapsfnyppipaylqghnllkahaevvhmyr : 245

```

```

      *          260          *          280          *          300          *          320
AAF49418 : elfgqprgggmgiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 314
EAL30328 : dlfgqprgggmgiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 314
XP_557100 : stfiesvqggkigiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 314
XP_316460 : stfiesvqggkigiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 289
AAG26008 : sdrfaeongggiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 309
BAB91145 : qefraeongggiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 317
AAL25999 : enfkptqngkigiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 289
AAP13852 : ekyptrngkigiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 310
AAC06038 : refirpvggggkigiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 311
AAL40863 : eefirpvggggkigiltdtswppeprdpnsaeasramgfvygwfghpifskhgnypkvmierirnlскеggfarsrlpef : 326

```

```

      *          340          *          360          *          380          *          400          *
AAF49418 : tteehirrigtadffginsytsnlvtsnghnntgkfpvpsfnhdmgvvesqegvdp-w-gsgsvwlkvypkgmynllmwihre : 395
EAL30328 : tteehirrigtadffginsytsnlvtsnghnntgkfpvpsfnhdmgvvesqegvdp-w-gsgsvwlkvypkgmynllmwihre : 395
XP_557100 : tteehirrigtadffginsytsnlvtsnghnntgkfpvpsfnhdmgvvesad-pdwp-ksgsvwlkvypkgmynllmwihre : 394
XP_316460 : tareinllrgssdfafalntyttslvskndanntagypvpsfnhdmgvvesad-pdwpvaeetsswikivpfglhlkllwikdn : 370
AAG26008 : tadeqemmgktfdflglnhyssdkvyfaedga-gdh--pehwadtgvglyqdas-w-pgsasswlkvypkgmynllmwihre : 386
BAB91145 : tadeqemmgktfdflglnhyssdkvyfaedga-gdh--pehwadtgvglyqdas-w-pgsasswlkvypkgmynllmwihre : 392
AAL25999 : tadeqemmgktfdflglnhyssdkvyfaedga-gdh--pehwadtgvglyqdas-w-pgsasswlkvypkgmynllmwihre : 364
AAP13852 : ddywirikgtadffginsytsnlvtsnghnntgkfpvpsfnhdmgvvesad-pdwp-ksgsvwlkvypkgmynllmwihre : 387
AAC06038 : tteehirrigtadffginsytsnlvtsnghnntgkfpvpsfnhdmgvvesad-pdwp-ksgsvwlkvypkgmynllmwihre : 389
AAL40863 : tteehirrigtadffginsytsnlvtsnghnntgkfpvpsfnhdmgvvesad-pdwp-ksgsvwlkvypkgmynllmwihre : 403

```

```

      *          420          *          440          *          460          *          480          *
AAF49418 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 471
EAL30328 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 471
XP_557100 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 470
XP_316460 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 446
AAG26008 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 463
BAB91145 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 469
AAL25999 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 441
AAP13852 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 464
AAC06038 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 469
AAL40863 : y-napeilvtenvgfsd---rgglddyarvdyynylsavladam-edganisgyiawslmdsyewkagftekfglyhvdns : 481

```

```

      *          500          *          520          *          540          *          560
AAF49418 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 541
EAL30328 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 543
XP_557100 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 499
XP_316460 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 473
AAG26008 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 502
BAB91145 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 498
AAL25999 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 464
AAP13852 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 491
AAC06038 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 509
AAL40863 : pqrtrpkiarvfa---gckentdwsyprkldedqqlvamaqlpae---artsgasgavswslmgillallr : 534

```

Abbildung 3.10: Verschiedene β -Glucosidasen aus Insekten. AAF49418 und EAL30328: *Drosophila melanogaster*. XP557100 und XP316460: *Anopheles gambiae*. AAG26008: *Tenebrio molitor*. BAB91145: *Neotermes koshunensis*. AAL2599: *Brevicoryne brassicae*. AAP13852: *Bombyx mori*. AAC06038: *Spodoptera frugiperda*. AAL40863: *Leucophaea maderae*. -----: Positionen von P21, P22. P23 entspricht dem Primer P22, ist aber nach vorne gerichtet.

Mit Hilfe der Standard-PCR und den Primern P22 und Oligo(dT) wurde eine Bande von etwa 1400 Basenpaaren amplifiziert, welche in TOPO[®]-XL kloniert und dann in TOP10-Zellen transformiert wird. Zur Sequenzierung eines der Plasmide wurden die Klone wie unter 3.5.2 aufgearbeitet.

Die erhaltene Sequenz, im Folgenden GLU1 genannt, beinhaltet das Mittelstück und das 3'-Ende der gesuchten cDNA und war ohne Poly-A-Schwanz 1262 Basen lang. Die Sequenz zeigte auf Aminosäureebene Homologie zu den bekannten β -Glucosidasen aus Insekten, die in Abbildung 3.10 dargestellt wurden. Die Sequenzidentität betrug über 45%.

Aufgrund dieser Homologie wurden Primer zur Durchführung der 5'-RACE entworfen (siehe 2.4.1). Die drei genspezifischen Primer P24, P25 und P26 (siehe Anhang B) lagen im Bereich der ersten 420 Basen von GLU1. Mit dem Primer P24 wurde die cDNA synthetisiert, P25 und P26 konnten jeweils mit AAP als zweiten Primer in der PCR eingesetzt werden (siehe 2.4.8.4). In der PCR wurden verschiedene Annealingtemperaturen eingestellt, die alle jedoch kein gewünschtes Amplifikat ergaben. Daher wurde auch hier auf genomischer Ebene mit Adapter Ligation-PCR und Inverser PCR weitergearbeitet.

Für die Adapter Ligation-PCR wurde genomische DNA aus eingefrorenen Larven isoliert und wie in 2.4.8.2 beschrieben aufgearbeitet. *DpnI* wurde als Restriktionsenzym zum Schneiden der genomischen DNA verwendet. In einer ersten PCR wurden P25 (Forward) und AP1 (Reverse) eingesetzt. In der nested PCR führten P26 (Forward) und AP2 (Reverse) zu einem etwa 1800 bp großen Amplifikat. P25 und P26 waren genspezifische Primer, die für die 5'-RACE entworfen wurden (siehe oben). Die PCR-Bedingungen sind in einer Tabelle am Ende diesen Abschnitts zusammengefasst.

Die Sequenz, die mit Hilfe der Adapter Ligation-PCR erhalten wurde und im Folgenden GLU2 genannt wurde, hatte eine Länge von 1175 bp und überlappte das bekannte 3'-Ende mit einer Länge von 176 Basen. Auf Grundlage von GLU2 wurden Primer zur Durchführung einer Inversen PCR entworfen, da mit dieser Methode längere PCR-Amplifikate erhalten werden können.

Für die Inverse PCR wurde wieder genomische DNA isoliert, mit dem Restriktionsenzym *BsaAI* geschnitten und aufgearbeitet (siehe 2.4.8.3). In der PCR wurden die Primer P27 und P28 eingesetzt, die auf Grundlage von GLU2 entworfen wurden (siehe Anhang B). P27 ist ein Reverse-Primer, der zum 5'-Ende der Sequenz zeigte und mit der 244. Base begann. P28 ist ein Forward-Primer, der zum 3'-Ende der Sequenz zeigte, und mit der 317. Base anfang.

Die Inverse PCR führte zu einer weiteren Sequenz, im Folgenden GLU3 genannt, die mit GLU2 eine Überlappung von 230 Basen aufwies. GLU3 enthielt ein Startcodon, welches in seiner Lage in einem Alignment den Startcodons anderer β -Glucosidasen entsprach.

Da GLU2 und GLU3 mit der Adapter Ligation-PCR bzw. der Inversen PCR erhalten wurden, handelte es sich um genomische Sequenzen, die Introns enthielten. Diese Introns wurden auf zwei verschiedenen Wegen erkannt und aus den Sequenzen herausgeschnitten, so dass die erhaltene Gesamtsequenz eine hypothetische cDNA-Sequenz einer β -Glucosidase ist. Der erste Weg war der Vergleich von GLU2 und GLU3 mit anderen genomischen DNA-Sequenzen, die für eine β -Glucosidase codieren. Bei diesen genomischen Sequenzen handelte es sich um die in Abbildung 3.10 dargestellten Sequenzen. Desweiteren ist bekannt, dass Introns mit den Basen GT anfangen und mit AG aufhören.

Auf diese Weise wurde eine hypothetische cDNA-Sequenz aus GLU1, GLU2 und GLU3 zusammengesetzt, die im Folgenden GLU.hyp genannt wird. In GLU3 wurde bei der 985. Base (mit Introns) ein Methionin als Startcodon der Sequenz vermutet. Die zusammengesetzte Sequenz GLU.hyp (ohne Introns) hätte demnach ab dem Startcodon bis zum Stoppcodon eine Länge von 1680 Basen bzw. 560 Aminosäuren. Durch SignalP3.0 (siehe 2.4.15) wurde ein Signalpeptid vorhergesagt, das mit Methionin als Startcodon beginnt und 26 Aminosäuren lang ist. Das durch SignalP3.0 vorhergesagte Signalpeptid enthielt das Methionin, welches als Startcodon vermutet wurde und somit bestätigt wird.

Tabelle 3.5: PCR-Bedingungen zum Erhalt der Sequenz von GLU.hyp

Bedingungen	GLU1	GLU2 (I)
PCR-Programm	Standard-PCR konstant	Adapter Ligation-PCR touch down
Taq-Polymerase	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)
Annealing-Temperatur	57, 8°C	60°C auf 45°C
Primer	P22 + Oligo(dT)	P25 + AP1
Bandengröße	ca. 1400 bp	Schmier
Klonierung	TOPO®-XL	TOPO®-XL
	GLU2 (II)	GLU3
PCR-Programm	nested touch down	Inverse PCR touch down
Taq-Polymerase	AccuTaq (Sigma)	AccuTaq (Sigma)
Annealing-Temperatur	60°C auf 45°C	65°C auf 50°C
Primer	P26 + AP2	P27 + P28
Bandengröße	ca. 1800 bp	ca. 1500 bp
Klonierung	TOPO®-XL	TOPO®-XL

3.5.4 Vergleich mit Datenbanken

Die Sequenz GLU.hyp, die aus genomischen Sequenzen zusammengesetzt wurde und keine Introns mehr enthielt (siehe 3.5.3), hatte auf Aminosäureebene zu den in Abbildung 3.10 dargestellten Sequenzen eine Sequenzidentität von über 50%. Hoch konservierte Bereiche dieser β -Glucosidasen waren auch in GLU.hyp zu erkennen. Leider lagen zu diesem Zeitpunkt keine lebenden Larven von *C. tremulae* vor, um folgende Versuche durchzuführen:

1. GLU.hyp ist eine hypothetische Sequenz auf Grundlage genomischer Sequenzen, deren Introns entfernt wurden. Eine PCR mit Full-length-Primern und cDNA als Template und eine anschließende Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate ist nötig, um sicherzustellen, dass die Introns korrekt entfernt worden sind.
2. Ist die cDNA von GLU.hyp sicher sequenziert, kann die cDNA in einen Vektor zur heterologen Expression in *E. coli* kloniert werden. Das so produzierte Protein müsste dann in Aktivitäts- und Substrattests zur Überprüfung der β -Glucosidase-Aktivität von GLU.hyp untersucht werden.
3. Zudem ist die Untersuchung der Substratspezifität des entsprechenden Enzyms und eine Analyse der gewebespezifischen Expression wichtig, um festzustellen, ob GLU.hyp aus dem Wehrsekret stammt und somit an der Wehrsubstanzbildung beteiligt ist.

3.6 Sequenzierung von Peptiden aus dem Wehrsekret von *Ph. cochleariae*

Die Larve von *Ph. cochleariae* produziert Chrysomelidial im Wehrsekretreservoir (siehe 1.1.2.1). Als Ausgangssubstanz wird Mevalonsäure vermutet, welches glykosiliert als 8-Hydroxygeraniolglucosid in das Wehrsekretreservoir gelangt. Dort wird das Glucosid von einer Glucosidase gespalten und der Dialkohol zum Dialdehyd oxidiert, welcher zum Chrysomelidial cyclisiert wird (Daloze und Pasteels, 1994; Feld et al., 2001; Kuhn, 2005).

Die autogene *de novo*-Synthese iridoider Monoterpene ist der Ursprung der Wehrsekrete von Chrysomeliden-Larven. Der autogene Weg wurde durch die wirtspflanzenabhängige Strategie der Salicylaldehydsynthese ersetzt, nachdem die Tiere aus ökologischen Gründen ihre Wirtspflanze gewechselt und sich auf Salicaceen spezialisiert haben (siehe 1.1.2.4).

Vergleicht man die ersten zwei Schritte der *de novo*-Synthese der iridoiden Monoterpene und die Bildung von Salicylaldehyd (Abbildung 1.14) wird deutlich, dass in beiden Biosynthesewegen die Substrateigenschaften ähnlich sind und eine Glucosidase und eine Oxidase beteiligt sind. Diese Ähnlichkeit unterstützt die These, dass die zweite Strategie aus der ersten autogenen Strategie entstanden ist (siehe 1.2).

In diesem Teil der Arbeit sollen zunächst die im Wehrsekret enthaltenen Proteine mit Hilfe der MS/MS-Sequenzierung teilsequenziert werden. Die Peptidsequenzen wurden zum Ent-

wurde degenerierter Primer verwendet, um mit der PCR cDNA-Sequenzen zu erhalten.

Das Wehrsekret von *Ph. cochleariae* wurde mit Hilfe einer Glaskapillare gesammelt (siehe 2.2.1). Mit dieser Probe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und mit Coomassie gefärbt (siehe 2.5.4 und 2.5.7, Abbildung 3.11).

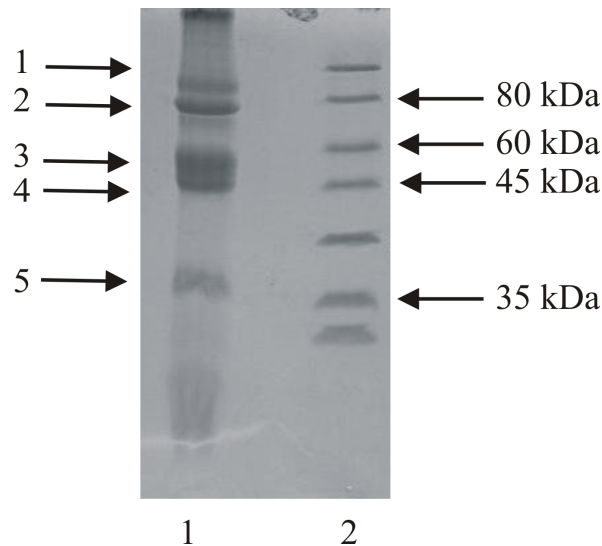


Abbildung 3.11: SDS-PAGE des frischen Wehrsekretes von *Ph. cochleariae*. 1 Wehrsekret: Die mit 1-5 gekennzeichneten Banden wurden einzeln sequenziert. 2 10 kDa Proteinleiter (Fermentas)

Insgesamt wurden fünf Banden ausgeschnitten, jeweils gewaschen und getrocknet und ins HZI zur MS/MS-Sequenzierung geschickt (siehe 2.5.14). Die Sequenzierung zeigte, dass es sich scheinbar nicht um fünf verschiedene Proteine handelt, da das Peptidmuster bei den unterschiedlichen Banden sehr ähnlich aussah. Vermutlich handelte es sich bei den niedermolekularen Banden um Abbauprodukte der größeren Banden. Die Proteine waren teilweise glykosiliert.

Da bekannt ist, welche Enzyme an der Wehrsekretbildung des Chrysomlidials beteiligt sein könnten (siehe 1.1.2.1), wurde bei Datenbankvergleich der Peptidsequenzen Homologie zu Glucosidasen, Oxidasen oder Cyclasen erwartet. Dies traf jedoch nicht zu. Der Datenbankvergleich ergab keine eindeutige Homologie zu bekannten Proteinen. Desweiteren wurde mit zwei Peptidsequenzen, die aus der gleichen Bande stammten, nie Homologie zu einem identischen Protein gefunden. Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein noch unbekanntes Protein handelt.

Mit Hilfe der Peptide wurden sechs verschiedene degenerierte Primer entworfen, um die cDNA des Proteins identifizieren zu können:

Tabelle 3.6: Peptidsequenzen aus *Ph. cochleariae*

Bande		Peptid	Primer
1.Bande	1. 2. 3.	YELDS LYTENLISSVPR FLGGNEQFLN	P29 (Forward) / P30 (Reverse)
2.Bande	1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.	FCGDR LQMNLR GDATVSDVR TDDGVLC QFLYLQ AVLCATTLDNGR LLASLNENLDQL	P31 (Forward) / P32 (Reverse)
3.Bande	1. 2. 3.	YELDS LYTENLISSVPR DTSLQMYLNHENVSDVR	wie 1.Bande wie 1.Bande P33 (Forward) / P34 (Reverse)
4.Bande	1. 2. 3. 4. 5. 6.	LQMNLR GDATVSDVR VDSATMLVGFR TDDGVLC QFLYLQ PGHPCCSTP	wie 2.Bande wie 2.Bande wie 2.Bande wie 2.Bande
5.Bande		schlechte Qualität der Signale	

3.6.1 Probleme bei der RNA-Isolierung und RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde mit TRIZOL[®] Reagenz (siehe 2.4.2) isoliert. Wie bei *C. tremulae*-Larven wurde versucht, das Wehrsekret abzumelken. Das Melken mit Glaskapillaren erwies sich als schwierig, da das Wehrsekret sehr zähflüssig ist. Daher wurde versucht, das Wehrsekret mit Filterpapier aufzusaugen.

Es wurden verschiedene PCR-Versuche durchgeführt. Als Primer dienten die in Tabelle 3.6 bereits erwähnten Forward-Primer in Kombination mit Oligo(dT), sowie Kombinationen untereinander. Zusätzlich wurden verschiedene Polymerasen getestet. Erhaltene PCR-Amplifikate wurden anschließend in den TOPO[®]-XL-Vektor kloniert und dann in TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.4.10.1 und 2.4.11). Zur Überprüfung der Transformation wurden nach der Plasmidisolierung (siehe 2.4.5) die Plasmide mit *EcoRI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.4.12). Einer der Plasmide, bei denen die Transformation erfolgreich war, wurde sequenziert (siehe 2.4.14).

Die Sequenzierung zeigte, dass nach dem Forward-Primer direkt ein Stoppcodon folgte. Im weiteren Verlauf der Sequenzen befanden sich ebenfalls viele Stoppcodons. In einigen Fällen lagerte sich der gleiche Primer sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende an. Diese unspezifische Anlagerung wurde bei verschiedenen Primer-Kombinationen beobachtet. Durch Erhöhung der Annealingtemperatur sollte eine unspezifische Anlagerung vermieden werden. Dies führte dazu, dass sich die Primer nicht mehr anlagerten und keine PCR-Amplifikate

erhalten wurden.

Kapitel 4

Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung der SAO-codierenden cDNA aus *C. tremulae* sowie der cDNAs, die für die Katalase und die β -Glucosidase codieren. Die an der Bildung der Wehrsubstanz Salicylaldehyd im Wehrsekret beteiligten drei Enzyme werden von Drüsenzellen in das Reservoir sekretiert. Dort befindet sich das aus der Wirtspflanze aufgenommene Phenolglucosid Salicin, das als Substrat für die Wehrsubstanzbiosynthese fungiert.

Aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) ist bereits bekannt, dass die zwei Chrysomela-Arten *C. populi* und *Ph. vitellinae* Salicin mit Hilfe einer β -Glucosidase hydrolisieren. Der entstandene Salicylalkohol wird von der SAO zu Salicylaldehyd oxidiert. Unter Nutzung von Luftsauerstoff wird dabei H_2O_2 freigesetzt, welches durch eine Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt und damit entgiftet wird.

In dieser Arbeit wurden die ersten Versuche mit *C. tremulae* durchgeführt, da nur diese Art zur Verfügung stand. Erst im späteren Verlauf waren auch Larven und Käfer von *C. populi* vorhanden. *C. tremulae* bildet wie *C. populi* und *Ph. vitellinae* Salicylaldehyd als Wehrsubstanz im Wehrsekret, so dass mit dieser Art weitere Versuche auf der Grundlage der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) durchgeführt werden konnten.

Die Identifizierung von SAO codierenden cDNAs soll zeigen, ob sich der innerhalb der *Chrysomela*-Arten vermutete phylogenetische Ursprung der Sequestrierung pflanzlicher Phenolglucoside (Wehrsubstanz Salicylaldehyd) aus der autogenen Verteidigungsstrategie (iridoide Monoterpene als Wehrsubstanz) ableitet.

4.1 Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreductasen

Die Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreductasen (GMC) gehören zu einer Enzymfamilie, deren Proteine zwar homolog sind, die aber diverse katalytische Aktivitäten umfasst. Diese Enzymfamilie wurde von Cavener (Cavener, 1992) beim Vergleich verschiedener Enzyme entdeckt (siehe 3.1.1). Es handelt sich um Flavoproteine, die sowohl bei den Prokaryonten als auch bei den Eukaryonten auftauchen. Die Enzyme enthalten eine hoch konservierte FAD-Bindungsstelle, die sich bei allen untersuchten Enzymen etwa 60 Aminosäuren nach dem Start-Methionin befindet (siehe Abbildung 3.3). Die Evolution demonstriert mit der

GMC-Familie eine Flexibilität, die es ermöglicht, Enzyme mit diversen katalytischen Aktivitäten hervorzubringen, die eine sehr ähnliche Struktur aufweisen.

Zamocky *et al.* (Zamocky *et al.*, 2004) hat die verschiedenen GMCs hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität in einer Liste zusammengefasst. Es konnten elf verschiedene Reaktionen aufgelistet werden. Die Substratspezifität reicht von Monosacchariden bis zu Cholesterol und weist eine hohe Diversität auf. Die Reaktionen, die diese Enzyme katalysieren, haben dementsprechend eine hohe Bandbreite.

Eine phylogenetische Untersuchung von 52 Enzymen, die der GMC-Familie zugeordnet werden, legt nahe, dass diese Flavoprotein-Familie in fünf verschiedene Gruppen, ungeachtet ihres Wirtsorganismus, eingeteilt werden kann. Zu den Wirtsorganismen gehören sowohl Eukaryonten als auch Prokaryonten.

1. Gruppe: Alkohol-Oxidasen (CAC38303), Glucose-Dehydrogenasen (Q9VI87), Glucose-Oxidasen (J05242) und Cholin-Dehydrogenasen (NP414845).
2. Gruppe: Hydroxynitril-Lyasen (Q9M4V5).
3. Gruppe: Cholesterol-Oxidasen (P22637).
4. Gruppe: Dehydrogenasen mit diversen oder noch unbekannten Spezifitäten (Q9LN93).
5. Gruppe: Cellobiose-Dehydrogenasen (AF029668).

Die in Klammern angegebenen Nummern sind Beispiele für Proteine, die unter der angegebenen Nummer in der Datenbank NCBI zu finden sind.

Bei einem Großteil der in der Datenbank NCBI gespeicherten Sequenzen handelt es sich um Proteine, deren Aktivität vorhergesagt, jedoch noch nicht bewiesen ist. Nur bei wenigen Proteinen ist ihre biologische Bedeutung untersucht bzw. bekannt. Aus *Drosophila melanogaster* ist eine Glucose Dehydrogenase (Q9VI87) isoliert worden, die eine essentielle Rolle im Aufbau von Cutikularen spielt.

Bei der Untersuchung des Wehrsekrets von *C. populi* mit der 2D-Elektrophorese wurde ein Peptid sequenziert, welches zum ersten Mal eine deutliche Homologie zu verschiedenen *Drosophila*-Sequenzen aufwies, die zur Enzymfamilie der GMCs gehören (siehe 3.1.1). Alle weiteren Aminosäuresequenzen aus *C. populi* und *C. tremulae*, die in dieser Arbeit im Rahmen des SAO-Projektes gefunden wurden, zeigen eine Sequenzidentität von über 50% zu den GMCs verschiedener Organismen. Zu diesen Organismen gehören *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* und *Apis mellifera*. Die GMCs dieser Insekten können der ersten und größten Gruppe der GMCs zugeordnet werden. Da die SAO eine Oxidase-Aktivität aufweist und als Substrat einen Alkohol (Salicylalkohol) verwendet, wäre es sehr plausibel, wenn auch die SAO dieser Enzymfamilie angehört.

Aus einem Blattkäfer sind bereits mehrere Proteine bekannt, die aufgrund ihrer Homologie der GMC-Familie zugeordnet werden können. Es handelt sich um den Roten Reiskäfer (*Tribolium castaneum*). Bei diesen Proteinen (z. B. XP968177, XP968478, XP967340) handelt

es sich um im Genomprojekt aufgelistete Sequenzen, die als putative Proteine eine deutliche Homologie zu den Glucose Dehydrogenasen aus *Drosophila melanogaster* (CG9503) zeigen, die zur Familie der GMCs gehören.

4.2 GMC-homologe Sequenzen aus *C. tremulae* und *C. populi*

Die RNA-Isolierung aus den Larven der zwei *Chrysomela*-Arten *C. tremulae* und *C. populi* und die cDNA-Synthese barg mehrere Hindernisse, die erst nach einigen Versuchen gelöst werden konnten. Vor der RNA-Isolierung mussten die Larven gemolken und somit komplett von Salicylaldehyd befreit werden, da vermutlich durch die Zerstörung der Drüsen die RNA mit dem Aldehyd des Wehrsekrets interagierte, so dass die benachbarte RNA vernetzt wurde und eine effiziente RNA-Isolierung aus den Drüsen verhinderte.

Es wurden zwei Kits zur RNA-Isolierung verwendet: TRIZOL[®] Reagenz von Invitrogen und RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen. Die Isolierung war nur dann erfolgreich, wenn die TRIZOL[®]-Methode (2.4.2.1) angewendet wurde. Mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (2.4.2.2) wurde stark degradierte Gesamt-RNA isoliert, mit der die anschließende Reverse Transkription und die PCR dagegen erfolglos waren. Dies könnte daran liegen, dass dieses Kit speziell zur RNA-Isolierung aus Pflanzen entwickelt wurde. Zwar ist vom Hersteller eine Anleitung zur Isolierung aus tierischem Gewebe vorhanden, diese führte aber wie oben beschrieben nicht zu den gewünschten PCR-Amplifikaten.

Nach der RNA-Isolierung wurde sofort die cDNA-Synthese durchgeführt. Normalerweise schützt die Lagerung der RNA bei -80°C diese vor Degradierung. Bei den RNA-Proben aus dem tierischen Gewebe der verwendeten *Chrysomela*-Arten scheint dies aber ein Problem zu sein: die RNA ist nach Lagerung degradiert. Die cDNA dagegen ist bei -20°C lange haltbar. Da junge Larven benötigt wurden, war darauf zu achten, dass vor ihrem Winterschlaf im Frühherbst genügend cDNA synthetisiert wurde, um ein Arbeiten während der Wintermonate zu gewährleisten.

Mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung konnte ein erstes Peptid aus dem Wehrsekret von *C. tremulae* identifiziert werden (3.2.1). Ein Vergleich der Peptidsequenz mit der Datenbank NCBI ergab keinen Hinweis auf eine Homologie zu einem bekannten Protein. Da die N-terminale Sequenzierung mit einem aus dem Wehrsekret stammenden Protein durchgeführt wurde, handelt es sich bei dem sequenzierten Peptid um einen Proteinteil aus dem Wehrsekret. Das Peptid wurde zudem aus einer Bande teilsequenziert, die der Größe der gesuchten SAO entsprach (3.2.1). Diese Gründe sprachen dafür, dass das Peptid ein Teil der SAO ist. Das Peptid wurde zum Entwurf eines degenerierten Primers verwendet und führte mit Hilfe der PCR zu der Sequenz SAO01.kurz. Die deutliche Homologie der SAO01.kurz-Aminosäuresequenz mit den GMCs deutete auf eine enge Verwandtschaft zu dieser Enzymfamilie hin (siehe 3.2.4).

Vergleiche der Sequenz der SAO01.kurz von *C. tremulae* mit den Peptiden aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) zeigten, dass das Peptid 2 ((S)IIQVL(Y)HQTA) aus *C. po-*

puli in SAO01.kurz zu finden ist. Da dieser Abschnitt aber nicht hoch konserviert ist, konnte Brückmann (Brückmann, 2002) keine Homologie zu den GMCs finden. Die N-terminalen Sequenzen aus *C. tremulae* und *C. populi* zeigten neun gleiche Aminosäuren von insgesamt 15.

Der Sequenzvergleich von SAO01.kurz mit anderen GMC-Sequenzen zeigte, dass diese Sequenz mit 525 Aminosäuren um etwa 100 Aminosäuren kürzer ist als andere GMC-Sequenzen. Betrachtete man jedoch einen anderen Leserahmen, in den man durch Hinzufügen einer Base vor dem Stoppcodon gelangte, entfiel das Stoppcodon und es war eine Homologie von 69% zu den *Drosophila*-Sequenzen feststellbar (siehe 3.2.4). Diese lange Sequenz, die durch Hinzufügen einer Base entstand, wurde SAO01.lang genannt (siehe 3.2.5.1) und hatte eine Länge von 623 Aminosäuren.

Diese Auffälligkeit führte zu den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Hypothesen:

1. Hypothese: Der frühe Stopp in der Sequenz von SAO01.kurz kann durch Genduplikation entstanden sein. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein Pseudogen, welches sich in mindestens einer Base von der tatsächlich aktiven SAO codierenden cDNA unterscheidet.
2. Hypothese: Der frühe Stopp kann auf einen Lesefehler der *Taq*-DNA-Polymerase oder einen Sequenzierfehler zurückzuführen sein.
3. Hypothese: Die Sequenz SAO01.kurz ist tatsächlich so kurz. Für die Aktivität der SAO ist der hintere Teil der Sequenz nicht mehr nötig.

Die aufgestellten Hypothesen wurden in Kapitel 3.2.5 untersucht.

SAO01.kurz zeigte in einem Enzymassay keine Aktivität (siehe 3.2.5.3). Daher war die dritte Hypothese widerlegt. Da SAO01.lang auch keine Aktivität zeigte (siehe 3.2.5.3), wurde die zweite Hypothese ebenfalls verworfen. Zudem führten wiederholte Sequenzierungen verschiedener Klone immer wieder zur gleichen Sequenz. Als DNA-Polymerase wurde die AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma verwendet, die Proof-Reading-Aktivität besitzt. Auch aus diesem Grund erschien ein Lesefehler der DNA-Polymerase als unwahrscheinlich (siehe 3.2.3). Die erste Hypothese, die besagte, dass es sich bei SAO01.kurz um ein Pseudogen handelt, ist daher vermutlich richtig.

Bei Pseudogenen handelt es sich um Mitglieder einer Genfamilie, die nach Genduplikation durch Mutationen so verändert wurden, dass sie ihre ursprüngliche Funktion völlig verloren haben. Normalerweise enthalten diese nicht funktionstüchtigen Gene eine oder mehrere inaktivierende Mutationen, beispielsweise eine Nonsense-Mutation, die ein frühzeitiges Stoppcodon einführt. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation, die ein Codon für eine Aminosäure in ein Stoppcodon umwandelt. Als Ergebnis wird ein verkürztes Protein codiert, dessen Aminosäuresequenz am Carboxylende einen Teil verloren hat. Solche Pseudogene nennt man konventionelle Pseudogene. Eine weitere Form ist das sogenannte prozessierte

(weiterverarbeitete) Pseudogen. Es handelt sich dabei nicht um eine durch Mutation veränderte Kopie des ursprünglichen Gens, sondern um eine DNA-Kopie der mRNA, die zurück ins Genom integriert wurde. Das Gen hat daher auch keine Introns, da diese bei der mRNA-Prozessierung entfernt wurden.

In einigen wenigen Fällen kann es nach Genduplikation durch Mutationen zu Genkopien kommen, die eine neue Funktion erhalten (Force et al., 1999). Ein Beispiel für diesen seltenen Fall ist die pflanzliche Homospermidinsynthase (HSS). HSS ist als erstes spezifisches Enzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese identifiziert worden. Sie katalysiert die Bildung von Homospermidin in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion aus jeweils einem Molekül Spermidin und Putrescin (Böttcher et al., 1993). Die pflanzliche Desoxyhypusinsynthase (DHS) kann mit der gleichen spezifischen Aktivität wie die HSS aus Spermidin und Putrescin Homospermidin synthetisieren (Ober und Hartmann, 1999a; Ober und Hartmann, 1999b; Ober et al., 2000; Ober et al., 2003). Diese Übereinstimmung der Reaktionen von HSS und DHS sowie ihre hohen Sequenzhomologien und kinetische Untersuchungen beider Enzyme unterstützen die Vermutung, dass die HSS im Laufe der Evolution nach Genduplikation aus der pflanzlichen DHS entstanden ist (Ober und Hartmann, 1999b; Ober und Hartmann, 2000). Diese These wird durch Protein-Protein-Bindungs- und kinetische Substrat-Kompetitionsstudien bestätigt (Ober et al., 2003). Demnach ist die alkaloidspezifische HSS eine DHS, die ihre Hauptaktivität, die Aminobutylierung des eIF5A (eukaryontischer Initiationsfaktor 5A), verloren hat, da sie ihr Substrat, den eIF5A, nicht mehr binden kann. Die Nebenaktivität, die Aminobutylierung von Putrescin, bleibt davon unberührt und wird daher zur Hauptaktivität.

Da SAO01.kurz vermutlich ein Pseudogen ist, wurde versucht, aus *C. tremuale* und einer nah verwandten Art von *C. tremuale*, *C. populi*, weitere SAO codierende cDNA-Sequenzen zu identifizieren (siehe 3.2.5.5, 3.2.5.4).

Die in Kapitel 3.2.5.5 und 3.2.5.4 beschriebenen Versuche führten zu jeweils einer Sequenz aus *C. tremuale* und *C. populi*. SAO03 wurde aus *C. populi* erhalten. Obwohl keine komplette Sequenz der SAO03 vorlag, konnte aufgrund dieser Teilsequenzierung festgestellt werden, dass SAO03 im Vergleich zu SAO01.kurz im Bereich des Stoppcodons von SAO01.kurz kein Stoppcodon aufwies und am 3'-Ende zu verschiedenen GMC-Sequenzen (z. B. CG9522) Homologie zeigte. Es wurde vermutet, dass die vollständige Sequenz der SAO03 ähnlich lang ist wie die GMC-Sequenzen (siehe 3.2.4).

Auch SAO01.neu, die aus *C. tremuale* erhalten wurde (siehe 3.2.5.5), zeigte mit verschiedenen Datenbanken auf Aminosäureebene Homologie zu den bereits bekannten GMCs. Zudem ist SAO01.neu mit 605 Aminosäuren bis zum ersten Stoppcodon ähnlich lang wie die GMCs (siehe 3.2.4). Der Vergleich der Sequenzen SAO01.neu und SAO01.lang wies eine Identität von 99% auf (Aminosäureebene). Dabei unterschieden sich die Sequenzen in zehn Aminosäuren bzw. 29 Basen. Dazu gehört ein Bereich, der in SAO01.kurz sechs Aminosäuren vor dem Stoppcodon liegt und den fünf Aminosäuren entspricht, die zum ersten Mal in SAO03 auftauchten (siehe 3.2.5.4).

Mit diesen Erkenntnissen aus den Sequenzen SAO03 und SAO01.neu ist ein weiterer Hinweis dafür gegeben, dass es sich bei SAO01.kurz um ein Pseudogen handelt.

Um zu beweisen, dass es sich bei SAO01.neu tatsächlich um die SAO-codierende cDNA handelt, muss die Sequenz in *E. coli* exprimiert werden, um die Aktivität zu prüfen.

SAO02, die aus *C. tremulae* erhalten wurde (siehe 3.3), ist vermutlich auch ein Pseudogen, da sich ein Stoppcodon im vorderen Bereich der Aminosäuresequenz befindet. Bis dahin ist die Sequenz homolog zu den vorliegenden Sequenzen SAO01.kurz, SAO01.neu und SAO03 und den GMCs. Sequenzierfehler und Lesefehler der DNA-Polymerase konnten auch hier ausgeschlossen werden, da wiederholte Sequenzierungen die gleiche Sequenz ergaben und die AccuTaq LA DNA Polymerase von Sigma (siehe 3.2.3) verwendet wurde. Weitere Versuche mit SAO02 wurden nicht durchgeführt.

Die Sequenzidentität der in der Arbeit erhaltenen Sequenzen aus *C. tremulae* (SAO01.kurz, SAO01.lang, SAO02, SAO01.neu) und *C. populi* (SAO03) werden in Tabelle 4.1 zusammen mit einer GMC-Sequenz aus *Drosophila melanogaster* (CG9522) zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Sequenzidentität verschiedener Sequenzen.

	SAO01.kurz	SAO01.lang	SAO02	SAO03	SAO01.neu	CG9522
SAO01.kurz	—	100%	55%	93%	99%	56%
SAO01.lang	100%	—	55%	89%	89%	57%
SAO02	55%	55%	—	29%	56%	56%
SAO03	93%	89%	29%	—	92%	58%
SAO01.neu	99%	89%	56%	92%	—	58%
CG9522	56%	57%	56%	58%	58%	—

Die MS/MS-Sequenzierung des Wehrsekrets von *C. populi* (3.1.1) hat gezeigt, dass es sich bei der SAO um ein Glykoprotein handelt. Glykoproteine sind grundsätzlich nur extrazelluläre Proteine. Grund für eine posttranslationale Modifikation der SAO könnte ein Schutz des Proteins sein. Das extrazelluläre Enzym befindet sich im Wehrsekret, das Salicylaldehyd enthält. Salicylaldehyd ist aufgrund seiner Aldehydeigenschaft eine hoch reaktive Substanz, die das Enzym eventuell schädigen kann. Zuckerreste könnten das Protein eventuell schützen. Außerdem ist es möglich, dass die Modifikation für die Aktivität des Enzyms nötig ist. Diese Möglichkeit sollte bei der Untersuchung der Aktivität beachtet werden: um ein Protein heterolog mit Modifikation zu exprimieren, können Hefen oder tierische Zellen (z. B. Insektenzellen) verwendet werden. *E. coli* ist nicht in der Lage, für Eukaryonten typische posttranslationale Modifikationen durchzuführen.

4.3 Nuklein- und Aminosäuresequenz der Katalase und einer β -Glucosidase aus *C. tremulae*

Das Wehrsekret von *C. tremulae*-Larven wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und die im Wehrsekret enthaltenen Proteine dadurch isoliert (siehe 3.4.1). Mit Hilfe der MS/MS-Sequenzierung wurden Peptide teilsequenziert, die eine deutliche Homologie zu Katalasen verschiedener Organismen zeigten (siehe 3.4.1). Auf Grundlage dieser Peptidsequenzen wurden degenerierte Primer entworfen, die zu einer cDNA-Teilsequenz führten, die auf Aminosäureebene Homologie zu Katalasen verschiedener Insekten aufwies (siehe 3.4.3). Versuche, die Sequenz mit Hilfe verschiedener PCR-Ansätze zu vervollständigen, schlugen aus unbekanntem Grunde fehl. Da zu diesem Zeitpunkt keine frischen Larven von *C. tremulae* zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese für eine 5'-RACE vorhanden waren, wurde auf genomische DNA ausgewichen, die aus bei -80°C gelagerten und gemolkenen Tieren stammte. Möglicherweise ist diese Lagerung zur DNA-Isolierung ebenso ein Problem, wie es sich bei der RNA-Isolierung herausgestellt hat (4.2).

Eine Vervollständigung der Sequenz kann zu einem Erfolg führen, wenn aus frischen gemolkenen Larven RNA isoliert und direkt mit genspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben wird.

Da die verwendeten Primer auf der Grundlage von Peptiden entworfen wurden, die aus dem Wehrsekret stammten, handelt es sich bei der erhaltenen cDNA-Sequenz vermutlich um eine Katalase-codierende cDNA aus dem Wehrsekret (siehe 3.4). Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass diese Primer möglicherweise auch zu anderen Katalase-Sequenzen führen, die nicht aus dem Wehrsekret stammen, da diese Sequenzen hoch konserviert sind und in einer PCR die Primer ebenfalls binden können.

Die β -Glucosidase, verantwortlich für den ersten Schritt der Bildung des Salicylaldehyds, befindet sich wie alle an der Wehrsubstanzbildung beteiligten Enzyme im Wehrsekret. Im Vergleich zu den Glucosidasen im restlichen Körper der Larve ist die Glucosidase-Aktivität in den Drüsen viermal höher (Pasteels et al., 1986; Pasteels et al., 1983). Mit Hilfe der MS/MS-Sequenzierung der Wehrsekretproteine war es nicht möglich, Peptide zu sequenzieren, die einer β -Glucosidase zugeordnet werden konnten (siehe 3.5.2). Grund dafür kann die geringe Konzentration der β -Glucosidase sein, so dass sie auf einem SDS-Gel nach Coomassie-Färbung nicht zu erkennen ist.

Von Pasteels ist bekannt (mündlich), dass bei Aktivitätstests der SAO immer eine Glucosidase-Aktivität auftrat. Es besteht die Möglichkeit, dass die SAO zusätzlich zur Oxidase auch eine Glucosidase-Aktivität besitzt. Es könnte sich daher um ein bifunktionelles Enzym handeln, was erklären würde, warum kein zusätzlicher Spot auf einem SDS-Gel einer β -Glucosidase zugeordnet werden konnte.

Desweiteren ist aus der Arbeit von Brückmann (Brückmann, 2002) bekannt, dass die β -Glucosidase im Wehrsekret von *C. populi* eine geringe Aktivität aufzeigte. Brückmann vermutete daher, dass es sich bei der β -Glucosidase um ein membrangebundenes Protein handelt. Das könnte erklären, warum bei der Untersuchung des Wehrsekrets mit elektrophoretischen Methoden, ausser beim Aktivitätstest (siehe 3.5.1), keine dem Enzym entsprechende

Bande gefunden werden konnte.

Da mit elektrophoretischen Methoden keine einer β -Glucosidase zugehörigen Bande gefunden und sequenziert werden konnte, wurde eine mögliche β -Glucosidase-codierende cDNA über einen revers-genetischen Ansatz mit degenerierten Primern aus *C. tremulae* isoliert. Die dazu für die PCR benötigten degenerierten Primer wurden auf der Basis eines Alignments verschiedener Glucosidasen aus Insekten entworfen (siehe 3.5.3). Die erhaltene Sequenz (GLU.hyp) zeigte eine Homologie von über 50% zu anderen Glucosidasen aus Insekten (siehe 3.5.4). Desweiteren wurde durch SignalP 3.0 und PSORT (2.4.15) ein Signalpeptid vorhergesagt, welches für ein extrazelluläres Enzym codiert (siehe 3.5.3). Um zu überprüfen, ob GLU.hyp die gesuchte β -Glucosidase aus dem Wehrsekret von *C. tremulae* ist, muss die cDNA in einen Vektor zur heterologen Expression in *E. coli* kloniert werden. Das so produzierte rekombinante Protein müsste dann in Aktivitäts- und Substrattests untersucht werden (siehe 3.5.4). Außerdem muss untersucht werden, ob die cDNA-Sequenz für die β -Glucosidase aus dem Wehrsekret codiert, da β -Glucosidasen sich nicht nur in der Drüse, sondern im gesamten Körper der Larve befinden, zum Beispiel im Darm (Pasteels et al., 1990). Leider lagen zum Zeitpunkt der Versuche keine lebenden Larven von *C. tremulae* vor, so dass keine weiteren Versuche gemacht werden konnten.

Eine weitere Methode zur Isolierung der β -Glucosidase aus dem Wehrsekret bzw. der Drüse ist das Präparieren der Drüsen. Mit Hilfe von Skalpell und einem Mikroskop kann einer frischen, nicht eingefrorenen und mit Diethylether betäubten Larve die Rückenhaut inklusive Drüsen abgeschnitten werden. Entweder wird der vollständige Rücken zur RNA-Isolierung eingesetzt, oder die Drüsen können, ohne zu platzen, von der Haut abgelöst und zur RNA-Isolierung verwendet werden. Wichtig dabei ist, dass die Larven nicht in Stickstoff getötet werden, da die Drüsen dadurch platzen und die RNA der Drüsen in den Körper der Larve verteilt werden kann. Durch diese Methode wird die Konzentration der β -Glucosidase aus der Drüse erhöht, was zu einer effektiveren RNA-Isolierung und einer erfolgreichen PCR führen kann. Auch hier wurden aufgrund fehlender Larven keine weiteren Versuche durchgeführt.

In den Arbeiten von Feld (Feld, 2001) und Kuhn (Kuhn, 2005) werden die Transportmechanismen bei Chrysomeliden untersucht. Blattkäferlarven der Unterfamilie Chrysomelinae haben im Verlauf der Evolution mehrfach unabhängig voneinander Fähigkeiten zur Sequestrierung von glykosidisch gebundenen Substanzen aus Pflanzen entwickelt. Aus (Feld, 2001) ist bekannt, dass die Spezies, die *de novo* iridoide Monoterpene synthetisieren, auch in der Lage sind, Vorstufen der eigenen Wehrsubstanzen, beispielsweise 8-Hydroxygeranylglucosid, wenn diese in den Pflanzen vorkommen, unverändert mit der Nahrung vom Darm ins Reservoir zu transportieren. Chrysomeliden, die die Vorstufen ihres Wehrsekrets aus der Pflanze sequestrieren, nehmen unterschiedliche Glucoside ihrer Wirtspflanze auf. Larven, die Salicin sequestrieren, bilden im Reservoir Salicylaldehyd. Larven der *C. interrupta*-Gruppe nehmen Glucoside von Blatt-Alkoholen auf und verestern diese mit *de novo* gebildeten Carbonsäuren zu entsprechenden Blatt-Alkoholestern. Bei allen drei Typen der verschiedenen Wehrsubstanzen (Iridoide, aromatische Aldehyde, Blatt-Alkoholestere) müssen mindestens zwei

Membranen passiert werden. Die erste Membran ist die, die den Darm von der Hämolymphe trennt und die zweite Membran ist die, die Hämolymphe und die Reservoir voneinander scheidet.

Die Transportuntersuchungen mittels Thioglycosiden haben gezeigt, dass glucosidisch gebundene Metabolite aus der Nahrung selektiv vom Darm über die Hämolymphe ins Reservoir transportiert werden. 8-Hydroxygeraniol wird höchstwahrscheinlich im Fettkörper *de novo* synthetisiert und von dort ins Reservoir transportiert. Zudem wurde gezeigt, dass alle im Reservoir befindlichen Glucoside durch Glucosidasen hydrolysiert werden. Selektivere Oxidasen und Cyclasen transformieren nur wenige Substrate zu Wehrverbindungen wie Chrysomelidial und Salicylaldehyd, dagegen führt eine unselektive Transferase, die alle primären und sekundären Alkohole als Substrat akzeptiert, zur Veresterung sehr vieler Blatt-Alkohole zu den entsprechenden Butyraten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass den Blattkäfern zum einen durch die Veränderung der Selektivität des Transporters für glycosidische Metabolite und zum anderen durch veränderte Spezifitäten und Transformationen der involvierten Enzyme im Reservoir ermöglicht wird, auf erhöhten Selektionsdruck zu reagieren. Dieser Selektionsdruck kann durch ein verändertes Wirtspflanzenspektrum oder durch herbivoren Druck entstehen.

Diese Erkenntnisse sind ein weiterer Schritt der phylogenetischen Untersuchung der Wehrchemie der Blattkäfer, die die Vermutungen von Termonia *et al.* (Termonia *et al.*, 2001) (siehe 1.1.2.4) ergänzen.

Die Selektivität der Glucosidase ist in (Soetens *et al.*, 1993) untersucht worden: Larven, die ihr Wehrsekret *de novo* synthetisieren, besitzen eine Glucosidase, die keine hohe Selektivität aufweist. Ein ähnliches Resultat liefert die Untersuchung der Selektivität bei *C. populi* (Kuhn, 2005). Die Enzyme, die an der Bildung der Wehrsubstanz im Wehrsekret beteiligt sind, sind in der Lage, sowohl Salicin als auch 8-Hydroxygeranylglucosid zu hydrolysieren. Salicin wird deutlich schneller gespalten als das terpenoide Glucosid. Dies ist ein Hinweis auf eine in allen Spezies eventuell vorhandene ähnliche Glucosidase. Möglicherweise können alle Tiere alle an der Wehrsubstanzbildung beteiligten O-Glucoside hydrolysieren, sollten diese ins Reservoir gelangen.

4.4 Ausblick

Termonia *et al.* (Termonia *et al.*, 2001) hat mit seinen phylogenetischen Untersuchungen bereits gezeigt, dass die autogene *de novo*-Synthese iridoider Monoterpene die ursprünglichste Form der Wehrsekretbildung von Chrysomeliden-Larven ist. Der autogene Weg wurde durch die wirtspflanzenabhängige Strategie der Salicylaldehydsynthese ersetzt, nachdem die Tiere vermutlich aus ökologischen Gründen ihre Wirtspflanze gewechselt und sich auf Salicaceen spezialisiert haben. Diese zweite Strategie wiederum entwickelte sich zu einer gemischten Strategie aus autogener und wirtspflanzenabhängiger Synthese (siehe 1.1.2.4). Ein Vergleich der ersten beiden Schritte der Wehrsubstanzbildung der iridoiden Monoterpene und des Salicylaldehyds (Abbildung 1.14) zeigt, dass in beiden Biosynthesewegen die Substrateigen-

schaften ähnlich sind und eine Glucosidase und eine Oxidase beteiligt sind. Diese Ähnlichkeit unterstützt die These, dass die zweite Strategie aus der ersten Strategie entstanden ist (siehe 1.2).

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, erste Erkenntnisse der Wehrsekret-Enzyme auf molekularbiologischer Ebene zu erhalten. Ein Vergleich der Glucosidasen und der Oxidasen aus dem Wehrsekret auf molekularbiologischer Ebene könnte beweisen, dass die wirtspflanzenabhängige Strategie aus der autogenen Strategie entstanden ist. Durch Änderung der Substratspezifität der β -Glucosidase und der Alkoholoxidase konnte das aus der Pflanze sequestrierte Salicin in Salicylaldehyd umgesetzt werden (Pasteels et al., 1983).

In einem ersten Schritt wurden aus dem Wehrsekret von *C. tremulae* und *C. populi* Proteine isoliert, die mit Hilfe der MS/MS-Sequenzierung teilsequenziert wurden. Der Datenbankvergleich ergab eine deutliche Homologie zu GMCs. Zu den vielen verschiedenen katalytischen Reaktionen der GMCs gehört auch eine Alkoholoxidase-Aktivität (siehe 4.1). Bei der gesuchten SAO handelt es sich ebenfalls um eine Alkoholoxidase. Durch diese Homologie ist ein erster Hinweis auf die gesuchte SAO gegeben worden.

Es wurden insgesamt vier mutmaßliche SAO codierende cDNA-Sequenzen aus *C. tremulae* und *C. populi* identifiziert (siehe 3.2, 3.3). Auch diese Sequenzen zeigten wie die Peptide alle auf Aminosäureebene Homologie zu den GMCs (siehe 4.2). Zwei der Sequenzen, SAO01.neu aus *C. tremulae* und SAO03 aus *C. populi*, gelten als vielversprechende Kandidaten für die gesuchte SAO codierende cDNA. Eine heterologe Expression in *E. coli* oder Insektenzellen sowie ein anschließendes Enzymassay könnten die SAO-Aktivität dieser cDNA-Sequenzen beweisen. Die aus *C. populi* isolierte cDNA muss vorher noch vervollständigt werden (siehe 3.2.5.4).

Die Untersuchung des Wehrsekrets von *Ph. cochleariae* mit Hilfe der MS/MS-Sequenzierung hat zu mehreren Peptiden geführt, die keine Homologie zu den bereits bekannten Sequenzen aus *C. tremulae* und *C. populi* zeigten. Es wurde vermutet, dass es sich um Peptide handelt, die zu einem noch unbekannten Protein gehören, da auch keine Homologie zu Sequenzen aus den Datenbanken gefunden wurde (siehe 3.6). Die Peptidsequenzen sind ein erster Schritt, um mit Hilfe der PCR cDNA-Sequenzen aus *Ph. cochleariae* zu erhalten, die für Proteine aus dem Wehrsekret codieren. Die so erhaltenen cDNA-Sequenzen können dann mit den SAO- und β -Glucosidase-Sequenzen aus *C. tremulae* und *C. populi* verglichen werden. Dieser Vergleich soll auf molekularbiologischer Ebene den möglichen evolutiven Zusammenhang der Oxidasen aus der autogenen *de novo*-Synthese mit den Oxidasen aus der Sequestrierung phenolischer Glucoside belegen.

Die gefundene Katalase codierende cDNA aus *C. tremulae* muss noch vervollständigt werden. Da sich die Katalase im Laufe der Evolution in ihrer Substratspezifität vermutlich nicht geändert hat, beschränken sich die Untersuchungen auf die Identifizierung Katalase-codierender cDNAs aus dem Wehrsekret. Die aus *C. tremulae* isolierte β -Glucosidase ist vollständig. Da die degenerierten Primer jedoch nicht auf Peptide des Wehrsekrets entworfen wurden, ist nicht sichergestellt, dass die gefundene cDNA für die β -Glucosidase aus dem

Wehrsekret codiert. Daher ist ein Substrattest nötig. Sollte dieser nicht zu einem deutlichen Ergebnis führen, kann versucht werden, die β -Glucosidase codierende cDNA direkt aus den Drüsen der Larven zu isolieren (siehe 3.5.3).

Anhang A

Abkürzungen

Alle physikalischen Basisgrößen und abgeleitete Größen werden mit den international festgelegten Formelzeichen und den zugehörigen Einheiten des internationalen Systems (SI) abgekürzt.

abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation
FAD	Flavinadenindinucleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie - Massenspektroskopie
GMC	Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen
GSP	genspezifischer Primer
h	Stunde
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IM	Iridoide Monoterpene
IPG	Immobilized pH Gradient

IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektroskopie
m/v	Masse pro Volumen
MWG	Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (Chelat-Komplex)
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAO	Salicylalkohol-Oxidase
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	time-of-flight
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase

Der Einbuchstabencode der Aminosäuren:

A Alanin	M Methionin
C Cystein	N Asparagin
D Asparaginsäure	P Prolin
E Glutaminsäure	Q Glutamin
F Phenylalanin	R Arginin
G Glycin	S Serin
H Histidin	T Threonin
I Isoleucin	V Valin
K Lysin	W Tryptophan
L Leucin	Y Tyrosin

Die fünf Basen, aus denen die Primer aufgebaut sind:

- G Guanin
- A Adenin
- T Thymin
- C Cytosin
- I Inosin

Anhang B

Primer

	Primer zur Bearbeitung der SAO	T _M in °C
P01	5'- GA(CT) AA(CT) GA(CT) GG(ACGT) CA(AG) AA(CT) CA -3'	55,3
P02	5'- TA(CT) GA(CT) GA(AG) TT(CT) AC(AGTC) GG(AGTC) GA(CT) AT -3'	58,0
P06	5'- CCA GTT GTA GTC TGA ATA TT -3'	51,2
P07	5'- CTT CTC CTG CTT CCA GCA GAA GTA TAT -3'	63,4
P08	5'- ACC CCG AGG GTC CAG ATC CAA CAA TAT -3'	66,5
P09	5'- ATA TAC ATA TGC TTT ACG ATG AAT TTA CAG GTC ACA TAT CG -3'	66,4
P10	5'- ATA TAG TCG ACT ATT CCA TAA TCA TTC TTA ATG ATG TCT GAT -3'	65,5
P11	5'- ATA TAG CGG CCG CTC ATA TTC CAT AAT CAT TCT TAA TGA TGT CTG AT -3'	70,3
P12	5'- TA(CT) GA(CT) TT(CT) (AG)T(ACT) (AG)TI (AG)TI GG -3'	49,8
P13	5'- AA(CT) TAC ATG (AC)T(GCT) TAC (AG)II (AC)G(AGC) GG -3'	57,7
P14	5'- CC(GCT) GA(CT) A(AG)C AT(ACT) A(AG)I AI(CT) TG -3'	53,2
P15	5'- TCT CCC TGT GTT TGA CTT TA-3'	53,2
P16	5'- GAT CTT CCC TCC GGA CCG ATG GAT AT -3'	66,4
P17	5'- CAT CCA CTA CAG GTT CAC CTG ACT CAT ATT -3'	65,4
P35	5'- ATA TAC TGC AGA TGT CTGACC AAA TTC TCG ACG CAA C -3'	69,5
P36	5'- ATA TAG CGG CCG CTA ATT CAC TGT ATC TCT GTC TCG ATG A -3'	71,5

	Primer zur Bearbeitung der Katalase	T _M in °C
P03	5'- GG(ACGT) ACI AA(CT) TA(CT) GA(AG) CA(AG) (CT)T -3'	53,2
P04	5'- A(AG)(CT) TG(CT) TC(AG) TA(AG) TTI GT(AGCT) CC -3'	53,2
P05	5'- CA(GA) GA(TC) CC(GATC) GA(TC) TA(TC) GC(GATC) GT -3'	59,4
P18	5'- TCT CCA AGA TTT TGA TCA ACT TGA GAA AAT -3'	59,9

	Primer zur Bearbeitung der beta-Glucosidase	T_M in °C
P19	5'- AA(CT) ACI TT(CT) TT(CT) CA(AG) CA(AG) (CT)T -3'	49,1
P20	5'- GG(ACTG) AC(ACTG) TGG GA(CT) GGI TA(CT) TT(CT) GA -3'	61,5
P21	5'- A(CT)C A(AG)A T(ACT)G A(AG)G GIG (GC)IT GG(AG) A -3'	59,0
P22	5'- T(AT)(CT) CA(CT) TGG GAI (CT)TI CC(AGTC) CA(AG) -3'	56,9
P23	5'- (CT)TG (AGCT)GG IA(AG) ITC CCA (AG)TG (AG)(AT)A -3'	56,9
P24	5'- AAT ACT GGA TGA GCA TAT AA -3'	49,1
P25	5'- GCT GCA TGT GCT TTC AAA GCC GTA TAA -3'	63,4
P26	5'- CCC AAT CCA TAT CCT TGT CGG CAA AAA -3'	63,4
P27	5'- TTC TAA CTT CGT GGT TGA ACT TGA ATG T -3'	60,7
P28	5'- CAC ATC TCA TGT CTC AAT GAT GTC ATA TT -3'	61,0

	Primer zur Bearbeitung der Enzyme aus <i>Phaedon cochleariae</i>	T_M in °C
P29	5'- GGI AA(CT) GA(AG) CA(AG) TT(CT) (CT)T(AGCT) AA -3'	51,2
P30	5'- TTI A(AG)(AG) AA(CT) TG(CT) TC(AG) TT(AGCT) CC -3'	51,2
P31	5'- AC(AGCT) GA(CT) GA(CT) GGI GTI (CT)T(AGCT) TG -3'	56,3
P32	5'- CAI A(AG)I AC(ACGT) CC(AG) TC(AG) TC(ACGT) GT -3'	56,3
P33	5'- ATG TA(CT) (CT)TI AA(CT) CA(CT) GA(AG) AA(CT) GT -3'	53,5
P34	5'- AC(AG) TT(CT) TC(AG) TG(AG) TTI A(AG)(AG) TAC AT -3'	53,5

	Allgemeine Primer	T_M in °C
Oligo(dT)	5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT -3'	59,5

	GenomeWalker Adapter
Adapter A	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT -3'
Adapter B	3'- H2N-CCCGACCA-PO4 -5'

	AP-Primer	T_M in °C
AP1	5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C - 3'	58,4
AP2	5' - ACT ATA GGG CAC GCG TGG T - 3'	58,8

Literatur

- Armer, C. A. (2004). Colorado potatoe beetle toxins revisited: evidence the beetle does not sequester host plant glycoalkaloids. *Journal of Chemical Ecology*, 30:883–888.
- Bellmann, H. (1999). *Der neue Kosmos-Insektenführer*. Kosmos Naturführer.
- Berenbaum, M. R. (2004). *Blutsauger, Staatsgründer, Seidenfabrikanten. Die zwiespältige Beziehung von Mensch und Insekt*. Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids research*, 7:1513–1523.
- Böttcher, F., Adolph, R. D. und Hartmann, T. (1993). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 32:679–689.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Brown, W. J. (1956). The new world species of *Chrysomela* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Entomology*, 88:1–54.
- Brückmann, M. (2002). *Aufnahme und Metabolisierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden durch Ithomiiden sowie Untersuchungen zur enzymatischen Bildung von Salicylaldehyd im Wehrsekret von Chrysomeliden*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Brückmann, M., Termonia, A., Pasteels, J. M. und Hartmann, T. (2002). Characterization of an extracellular salicyl alcohol oxidase from larval defensive secretions of *Chrysomela populi* and *Phratora vitellinae* (Chrysomelina). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1517–1523.
- Campbell, N. A. und Reece, J. B. (2003). *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage.
- Cavener, D. R. (1992). GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *Journal of Molecular Biology*, 223:811–814.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 69:2110–2114.

- Daloze, D., Braekman, J. C., Delbrassine, A. und Pasteels, J. M. (1991). Polyoxygenated steroid sophorosides from the defense glands of *Chrysolina quadrigemina*. *Journal of Natural Products*, 54:1553–1557.
- Daloze, D., Braekman, J. C. und Pasteels, J. M. (1985). New polyoxygenated steroidal glucosides from *Chrysolina hyperici* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Tetrahedron Letters*, 26:2311–2314.
- Daloze, D., Braekman, J. C. und Pasteels, J. M. (1986). A toxic dipeptide from the defense glands of the Colorado beetle. *Science*, 233:221–223.
- Daloze, D. und Pasteels, J. M. (1979). Production of cardiac-glycosides by Chrysomelid beetles and larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 5:63–77.
- Daloze, D. und Pasteels, J. M. (1994). Isolation of 8-hydroxygeraniol-8-*O*- β -D-glucoside, a probable intermediate in biosynthesis of iridoid monoterpenes, from defensive secretions of *Plagioderma versicolora* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Chemical Ecology*, 20:2089–2097.
- Deroe, C. und Pasteels, J. M. (1977). Defensive mechanisms against predation in the colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Archives de Biologie*, 88:289–304.
- Deroe, C. und Pasteels, J. M. (1982). Distribution of adult defense glands in chrysomelid (Coleoptera: Chrysomelidae) and its significance in the evolution of defensive mechanisms within the family. *Journal of Chemical Ecology*, 8:67–82.
- Dettner, K. und Peters, W. (1999). *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 2. Auflage.
- Dierl, W. (2001). *Welcher Käfer ist das? Die häufigsten Arten Mitteleuropas*. Franckh-Kosmos Verlag, 2. Auflage.
- Dobler, S., Daloze, D. und Pasteels, J. M. (1998). Sequestration of plant compounds in a leaf beetle's defensive secretion: cardenolides in *Chrysochus*. *Chemoecology*, 8:111–118.
- Eisner, T. (2004). *For love of insects*. The Belknap Press of Harvard University Press.
- Feld, B. K. (2001). *Evolution der Wehrchemie von Blattkäferlarven: Glucosid-Analoga zur Aufklärung von Transport-Mechanismen*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Feld, B. K., Pasteels, J. M. und Boland, W. (2001). *Phaedon cochleariae* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes *de novo* and are able to sequester glycosidically bound terpenoid precursors. *Chemoecology*, 11:191–198.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. und Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151:1531–1545.
- Frohmann, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleo-

- tide primer. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 85:8998–9002.
- Garb, G. (1915). The eversible glands of a chrysomelid larva, *Melasoma lapponica*. *Journal of Entomology and Zoology*, 8:88–97.
- Gross, J., Fatouros, N. E. und Hilker, M. (2004a). The significance of bottom-up effects for host plant specialization in *Chrysomela* leaf beetles. *Oikos*, 105:368–376.
- Gross, J., Fatouros, N. E., Neuvonen, S. und Hilker, M. (2004b). The importance of specialist natural enemies for *Chrysomela lapponica* in pioneering a new host plant. *Ecological Entomology*, 29:584–593.
- Gross, J. und Hilker, M. (1995). Chemoecological studies of the exocrine glandular larval secretions of two chrysomelid species (Coleoptera): *Phaedon cochleariae* and *Chrysomela lapponica*. *Chemoecology*, 5/6:185–189.
- Gross, J., Podsiadlowski, L. und Hilker, M. (2002). Antimicrobial activity of exocrine glandular secretion of chrysomela larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 28:317–331.
- Hartmann, T. (1999). Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, 207:483–495.
- Hartmann, T. (2004). Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta*, 219:1–4.
- Hartmann, T. und Ober, D. (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, 209 Berlin: Springer-Verlag Berlin:207–243.
- Hilker, M. (1993). Chemische Ökologie juveniler Entwicklungsstadien der Blattkäfer (Coleoptera, Chrysomelidae). *Bayreuther Forum Ökologie*, 5.
- Hilker, M. (1994). *Egg deposition and protection of eggs in chrysomelidae*, 263–276. Novel aspects of the Biology of Chrysomelidae, Kluwer Academic Publishers.
- Hilker, M., Daloze, D. und Pasteels, J. M. (1992). Cardenolide glycosides from the adults and eggs of *Chrysolina fuliginosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia*, 48:1023–1027.
- Hilker, M. und Schulz, S. (1994). Composition of larval secretion of *Chrysomela lapponica* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its dependence on host plant. *Journal of Chemical Ecology*, 20:1075–1093.
- Hinton, H. E. (1951). On a little-known protective device of some chrysomelid pupae (Coleoptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London, Series A, General Entomology*, 26:67–73.
- Hochulie, E., Dobeli, H. und Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 411:177–184.
- Hollande, A. C. (1909). *Sur la fonction d'excretion chez les insectes salicicoles et en particulier sur l'existence des derives salicyles*. Dissertation, Faculte de Medecine et de Pharmacie de Lyon.

- Ish-Horowicz, D. und Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research*, 9:2989–2998.
- Kuhn, J. (2005). *Diversität der Wehrchemie von Blattkäferlarven - Sequestrierung und de novo Synthese als Aspekte der Evolution von Chrysomeliden*. Dissertation, Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Kuhn, J., Pettersson, E. M., Feld, B. K., Burse, A., Termonia, A. und Pasteels, J. M. (2004). Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 101:13808–13813.
- Laurent, P., Braeckmann, J. C., Daloze, D. und Pasteels, J. M. (2003). Biosynthesis of defensive compounds from beetles and ants. *European of Journal Organic Chemistry*, 15:2733–2743.
- Lewin, B. (2002). *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum- Akademischer Verlag, 6. Auflage.
- Lorenz, M., Boland, W. und Dettner, K. (1993). Biosynthesis of iridodials in the defensive glands of beetle larvae. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32:912–914.
- Machkour M'Rabet und Pasteels, J. M. (1999). Evolution of larval defensive secretions of *Chrysomela lapponica* (Chrysomelidae) according to their host plants. *ISCE Scientific Program and Abstracts, 16th annual Meeting Marseille, France, 1999*.
- Moore, B. P. (1967). Hydrogen cyanide in the defensive secretions of larval Paropsini (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the Australian Entomological Society*, 6:36–38.
- Naumann, C. (2003). *Klonierung und Expression einer für die Detoxifizierung von Pyrrolizidinalkaloiden verantwortlichen Flavin-abhängigen Monooxygenase aus Tyria jacobaeae*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Ober, D., Harms, R. und Hartmann, T. (2000). Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vernalis*: a revision. *Phytochemistry*, 55:305–309.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L. und Hartmann, T. (2003). Molecular evolution by change of function: alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusin synthase except binding the eIF5A precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278:12805–12812.
- Ober, D. und Hartmann, T. (1999a). Deoxyhypusin synthase from tobacco: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 274:32040–32047.
- Ober, D. und Hartmann, T. (1999b). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusin synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:14777–14782.

- Ober, D. und Hartmann, T. (2000). Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Molecular Biology*, 44:445–450.
- Pasteels, J. M., Braekmann, J. C. und Daloze, D. (1982). Chemical defence in chrysomelid larvae and adults. *Tetrahedron*, 38:1891–1897.
- Pasteels, J. M., Braekmann, J. C. und Daloze, D. (1988). *Chemical defense in the chrysomelidae*, 233–252. Biology of Chrysomelidae, Kluwer Academic Publishers.
- Pasteels, J. M., Daloze, D. und Rowell-Rahier, M. (1986). Chemical defense in chrysomelid eggs and neonate larvae. *Physiological Entomology*, 11:29–37.
- Pasteels, J. M., Duffey, S. und Rowell-Rahier, M. (1990). Toxins in chrysomelid beetles - possible evolutionary sequence from *de novo* synthesis to derivation from food-plant chemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 16:211–222.
- Pasteels, J. M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J. C., Daloze, D. und Duffey, S. (1989). Evolution of exocrine chemical defense in leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia*, 45:295–300.
- Pasteels, J. M., Rowell-Rahier, M., Braekmann, J. C. und Daloze, D. (1994). *Chemical defence of adult leaf beetles updated*, 289–301. Novel aspects of the Biology of Chrysomelidae, Kluwer Academic Publishers.
- Pasteels, J. M., Rowell-Rahier, M., Braekmann, J. C. und Dupont, A. (1983). Salicin from host plant as a precursor of salicylaldehyde in defensive secretion of chrysomeline larvae. *Physiological Entomology*, 8:307–314.
- Pasteels, J. M., Theuring, C., Windsor, D. und Hartmann, T. (2003). Uptake and metabolism of C¹⁴-rinderine and C¹⁴-retronecine in leaf-beetles of the genus *Platyphora* and alkaloid accumulation in the exocrine defensive secretions. *Chemoecology*, 13:55–62.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975). Metal chelat affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258:598–599.
- Randoux, T., Braekman, J. C., Daloze, D. und Pasteels, J. M. (1991). *De novo* biosynthesis of isoxazolin-5-one and 3-nitropropanoic acids derivatives of *Chrysomela tremulae*. *Naturwissenschaften*, 78:313–314.
- Randoux, T., Braekman, J. C., Daloze, D., Pasteels, J. M. und Riccio, R. (1990). New polyoxygenated steroid glycosides from the defense glands of several species of chrysomelina beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Tetrahedron*, 46:3879–3888.
- Renner, K. (1970). Über die ausstülpbaren Hautblasen der Larven von *Gastroidea viridula* Degeer und ihre ökologische Bedeutung. *Beiträge zur Entomologie*, 20:527–533.
- Rowell-Rahier, M. und Pasteels, J. M. (1986). Economics of chemical defense in chrysomelidae. *Journal of Chemical Ecology*, 12:1189–1203.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350–1354.
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E. F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schrimpf, G. (2002). *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum - Akademischer Verlag, 3. Auflage.
- Schulz, S., Gross, J. und Hilker, M. (1997). Origin of the defensive secretion of the leaf beetle *Chrysomela lapponica*. *Tetrahedron*, 53:9203–9212.
- Soetens, P., Pasteels, J. M. und Daloze, D. (1993). A simple method for in vivo testing of glandular activity on potential precursor of larval defensive compounds in *Phratora* species (Coleoptera: Chrysomelinae). *Experientia*, 49:1024–1026.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of clones genes. *Methods of Enzymology*, 185:60–89.
- Termonia, A., Hsiao, T. H., Pasteels, J. M. und Milinkovitch, M. C. (2001). Feeding specialization and host-derived chemical defense in chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 98:3909–3914.
- Termonia, A. und Pasteels, J. M. (1999). Larval chemical defence and evolution of host shifts in *Chrysomela* leaf beetles. *Chemoecology*, 9:13–23.
- Timmermans, M., Randoux, T., Daloze, D., Braekman, J. C., Pasteels, J. M., and Lesage, L. (1992). The chemical defense of Doryphorina beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 20:343–349.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. und Varshavsky, A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science*, 254:1374–1377.
- Van Oycke, S., Randoux, T., Braekman, J. C., Daloze, D. und Pasteels, J. M. (1988). New cardenolide glycosides from the defense glands of Chrysolinina beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Bulletin Des Societes Chimiques Belges*, 97:297–311.
- Veith, M., Dettner, K. und Boland, W. (1996). Stereochemistry of an alcohol oxidase from the defensive secretion of larvae of the leaf beetle *Phaedon armoraciae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron*, 52:6601–6612.
- Veith, M., Lorenz, M., Boland, W., Simon, H. und Dettner, K. (1994). Biosynthesis of iridoid monoterpenes in insects: defensive secretions from larvae of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron*, 50:6859–6874.
- Veith, M., Oldham, N. J., Dettner, K., Pasteels, J. M. und Boland, W. (1997). Biosynthesis of defensive allomones in leaf beetle larvae: stereochemistry of salicyl alcohol

- oxidation in *Phratora vitellinae* and comparison of enzyme substrate and stereospecificity with alcohol oxidases from several iridoid producing leaf beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 23:429–443.
- Wilcox, J. A. (1974). A review of the north american chrysomeline leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin*, 421. The University of the State New York.
- Zamocky, M., Hallberg, M., Ludwig, R., Divne, C. und Haltrich, D. (2004). Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene*, 338:1–14.